INHIBITORISCHER EFFEKT VON O- (ß-HYDROXYETHYL) -RUTOSIDEN AUF DIE HÄMOLYSE DURCH OBERFLÄCHENAKTIVE SUBSTANZEN IN VITRO

Herbert Biesendorfer

Diss
München
1984

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546002_0036

Aus dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie
der Universität München

Direktor: Prof. Dr. Wolfgang Forth

INHIBITORISCHER EFFEKT VON O-(ß-HYDROXYETHYL)-RUTOSIDEN AUF DIE HÄMOLYSE DURCH OBERFLÄCHENAKTIVE SUBSTANZEN IN VITRO

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Herbert Biesendorfer

aus

Freising

1984

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr.med. Wolfgang Felix
Mitberichterstatter:	Prof. Dr.med. Wolfgang Forth
Dekan:	Prof. Dr.med. Wolfgang Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 27.November 1984

Herrn Prof. Dr. W. Felix danke ich für die Stellung des Themas sowie für seine wertvollen Anregungen.

Herrn Dr. D. Wildenauer bin ich besonders dankbar für die bereitwillige Hilfe, die vielen Ratschläge und kritischen Diskussionen.

Frau R. Neumann danke ich für ihre unermüdliche Hilfe bei der Schreibarbeit.

Inhaltsverzeichnis

	Seite
A. Einleitung und Problemstellung	1
B. Experimenteller Teil	9
1. Material und Geräte	9
2. Hämolyse und ihre Hemmung durch HR	12
2.1 Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen von Hämolysinen und von HR	13
2.2 Zeitverlauf der Hämolyse	17
2.3 Hämolyse-Experimente mit Vorinkubation	18
2.4 Auswaschbarkeit der HR-Wirkung	21
3. Bindung von HR durch Erythrozyten	22
3.1 Photometrische Bestimmung von HR	22
3.2 Bestimmung von ^{14}C-markiertem HR	23
4. Erythrozytengestalt	28
C. Ergebnisse	30
1. Hämolyse durch oberflächenaktive Substanzen im isotonischen Milieu	30
2. Hemmung der Hämolyse durch HR	31
3. HR als nichthämolytische oberflächenaktive Substanz	34
4. Wirkung von HR auf den biphasischen Effekt unspezifischer Hämolysine im hypotonischen Milieu - Verschiebungsfaktoren	36
5. Zeitlicher Verlauf der Hämolyse mit und ohne HR - Wiederingangsetzen der Hämolyse durch nachträgliche Lysinzugabe	38
6. Hämolyse-Experimente mit Vorinkubation der Reaktionspartner	45
7. Auswaschbarkeit des HR-Effektes	49

Seite

8. Bindung von HR durch Erythrozyten 50
8.1 Photometrische Bestimmung von HR nach Inkubation mit Erythrozyten 50
8.2 Bestimmung von ^{14}C-markiertem HR nach Inkubation mit Erythrozyten 51
8.3 Antihämolytische Wirksamkeit von HR nach Inkubation mit Erythrozyten 56

9. Änderung der Erythrozytengestalt duch HR 56

10. Anhang: Inhibitorische Wirksamkeit von HR auf die Hämolyse von Kaninchenerythrozyten 57

D. Diskussion 58

1. Wertung der gefundenen Hämolyseinhibition durch HR 58

2. Versuch einer Charakterisierung der Hämolysine anhand der Hämolyseinhibition durch HR 60

3. Zur Frage des Wirkmechanismus der Hämolyseinhibition durch HR 62

4. Möglicher Zusammenhang der Ergebnisse aus der vorliegenden Arbeit mit anderen Wirkungen von HR 83

E. Zusammenfassung 88

F. Literaturverzeichnis 89

G. Lebenslauf 94

Abkürzungen

AH_{50}	"Antihämolyse 50%", Konzentration von HR, die benötigt wird, um eine 50% ige Hämolyse auf 25% zu verringern. Genaue Definition siehe S. 32 f.
^{14}C-HR	mit ^{14}C radioaktiv markiertes HR
CMC	kritische mizellare Konzentration "critical micellar concentration"
CPZ	Chlorpromazin
CTAB	Cetyltrimethylammoniumbromid
DOC	Natrium-Desoxycholat
H_{50}	Konzentration eines Hämolysins für 50% Hämolyse. Genaue Definition s. S. 13 ff.
Hb	Hämoglobin
HK	Hämatokrit
HR	O-(ß-Hydroxyethyl)-rutoside
MG	Molekulargewicht
SDS	Natiumlaurylsulfat "sodium dodecyl sulfate"
PBS	phosphatgepufferte isotonische Kochsalzlösung pH 7,4 "phosphate buffered saline"

A. EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG

O-(ß-Hydroxyethyl)-rutoside (HR) sind Derivate des Flavonoids Rutin. Die Flavonoide sind in das Blickfeld der Pharmakologie gerückt, seit die Arbeitsgruppe um SZENT-GYÖRGYI 1936 entdeckte, daß Versuchstiere, bei denen ein Skorbut erzeugt worden war, länger überlebten und geringere Kapillarschäden aufwiesen, wenn sie Ascorbinsäure aus natürlichen Quellen erhielten anstelle der gleichen Dosis gereinigten Vitamins.

Die unbekannte Substanz wurde Vitamin P genannt, da sie die Kapillarpermeabilität herabsetzt (P für "Permeabilität") und vermutet wurde, daß es sich um einen essentiellen Nahrungsfaktor handele. Eine "Vitamin-P-Mangelkrankheit" konnte jedoch nicht nachgewiesen werden (10). Später wurde das "Vitamin P" als eine Gruppe von Flavon-Glycosiden identifiziert - die wichtigsten sind Rutin, Quercetin und Hesperidin - und mit dem Sammelbegriff "Flavonoide" versehen (10, 27). Es handelt sich um wasserunlösliche gelbe Farbstoffe (10), von denen das Rutin wegen seiner Anwendung im medizinischen Bereich am besten untersucht ist.

In dem Bestreben, eine wasserlösliche Verbindung zu erhalten, wurde eine Substanz entwickelt, bei der die vier phenolischen Hydroxylgruppen des Rutins in unterschiedlichem Ausmaß durch Hydroxyethylgruppen substituiert sind.

Das entstehende Gemisch wird als O-(ß-Hydroxyethyl)-rutoside (HR) bezeichnet (27). Abb. 1 zeigt die dreifach substituierte Hauptkomponente (genaue Zusammensetzung s. "Material").

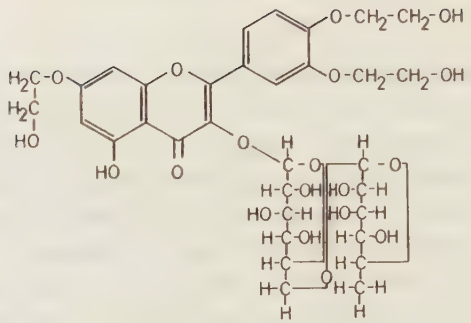


Abb. 1: Strukturformel von 3', 4', 7', Tri-O-(ß-Hydroxyethyl)-rutosid (Hauptkomponente von HR)

HR wird seit geraumer Zeit bei der Therapie verschiedener Gefäßleiden, wie der chronisch-venösen Insuffizienz (CVI), einigen allergischen Erkrankungen und der diabetischen Mikroangiopathie, angewandt. Die Wirksamkeit dieser Therapie ist umstritten, da kaum verwertbare klinische Studien existieren (7). Auf der anderen Seite liegt eine ganze Reihe von tierexperimentellen Untersuchungen vor, die eindeutige Ergebnisse geliefert haben. Ich möchte hier drei Wirkungen des HR herausgreifen, die im Hinblick auf diese Arbeit besonders interessant sind:

1. Ödemprotektiver Effekt:
   Eiweißreiche (d.h. entzündliche) Ödeme wie das Polidocanol- und Thiopentalödem des Katzenhinterlaufs (6) oder das Dextranödem der Rattenpfote (11) können durch vorherige Gabe von HR verhindert bzw. deutlich abgeschwächt werden. Auch sind die zugehörigen elektronenoptischen Endothelveränderungen schwächer ausgeprägt. Beim rein hämodynamisch verursachten Ödem ist HR unwirksam (7). Der ödemprotektive Effekt ist also

an Ödeme gebunden, die durch endothelschädigende Noxen hervorgerufen wurden. Dabei muß HR v o r der Noxe gegeben werden (7, 6).

2. Schutzwirkung an der glatten Gefäßmuskulatur: Etacrynsäure und Polidocanol schädigen nicht nur das Kapillarendothel, sondern auch glatte Gefäßmuskulatur. Dies zeigt sich in einer Abnahme der Kontraktilität isolierter Gefäßstreifen aus der Rattenpfortader. Wurde dem Organbad v o r Beginn der Schädigung HR zugesetzt, so war diese Wirkung signifikant schächer ausgeprägt (7, 8).

3. Schutz des Endothels vor bestimmten Nikotinwirkungen: Auch Nikotin schädigt Endothelien. Gibt man Ratten Nikotin in Dosen über 0,0125 mg/kg i.v. oder p.o., so lösen sich Endothelzellen von der Gefäßwand ab, und im zirkulierenden Blut ist der Gehalt an kernlosen Endothelzell-"Leichen" um ein Mehrfaches erhöht. Bereits durch HR-Dosen um 1 mg/kg (nur ein Bruchteil der klinischen Einzeldosis), v o r dem Nikotin gegeben, wird dieser Effekt vollständig unterdrückt (14).

Es fällt auf, daß diese drei Wirkungen des HR einen "gemeinsamen Nenner" haben: Zellen werden vor Noxen geschützt. Für den ödemprotektiven Effekt wurde schon mehrfach als zugrunde liegender Mechanismus eine unspezifische Protektion der Zellmembran gefordert (7, 11).

Mit dieser Arbeit sollte versucht werden, den geforderten membranprotektiven Effekt an einem einfachen "Membranmodell" nachzuweisen.

Aus folgenden Gründen ist der Erythrozyt geeignet: Seine Membran besitzt genügend "allgemeingültige" Eigenschaften, um als Modell dienen zu können (15, 30,

33, 41, 45). Der Erythrozyt hat keinerlei Organellen und ist mit einem löslichen Farbstoff gefüllt (Hämoglobin), der bei starker Membranschädigung frei wird (Hämolyse) und im Photometer sehr einfach quantitativ nachzuweisen ist.

Als Modell für eine Membranschädigung bietet sich daher die Hämolyse an: Freisetzung von Hämoglobin aus Erythrozyten.

Es gibt verschiedene Arten der Hämolyse. Nach Ursachen geordnet, kann man sie in vier Typen einteilen (mod. nach 18, 23, 27):

1. Osmotische Hämolyse
2. Hämolyse durch oberflächenaktive Substanzen
3. Immunhämolyse
4. Sonstige (mechanische Hämolyse, Hämolyse infolge genetischer Erythrozytendefekte etc.)

Die vorliegende Arbeit befaßt sich mit den beiden erstgenannten Hämolysetypen i n v i t r o .

Ihre gemeinsamen Merkmale sind:

1. Die Hämolyse folgt dem Alles-oder-nichts-Prinzip: Ein einzelner Erythrozyt hämolysiert entweder vollständig oder gar nicht (23). Eine Prozent-Hämolyse-Kurve (Hämolyse in % versus Osmolarität bzw. Lysin-Konzentration) zeigt also, wie viele Erythrozyten bei einer bestimmten Osmolarität oder bei einer bestimmten Konzentration eines Lysins bereits (vollständig) hämolysiert sind. Sie ist somit das Integral einer statistischen Verteilungsfunktion individueller Resistenzen innerhalb einer Erythrozytenpopulation gegenüber osmotischer Beanspruchung bzw.

gegenüber dem jeweiligen Lysin. Solche Prozent-Hämolyse-Kurven sind daher stets sigmoidal (23).

2. Der eigentlichen Hämolyse (Hb-Freisetzung) gehen stets weitere Veränderungen am Erythrozyten voraus, vor allem Gestaltänderung (9, 23, 40) und Elektrolytverlust (23, 30, 33).

3. Zwischen der Zugabe der Erythrozyten zum Hämolysemedium und dem Beginn der Hämolyse liegt stets eine gewisse Latenzzeit, die lag-Phase (4, 23, 24, 34, 35, 43).

Mit Ausnahme dieser drei Punkte sind die Vorgänge bei der osmotischen und bei der durch oberflächenaktive Substanzen bedingten Hämolyse wesentlich verschieden.

Die osmotische Hämolyse ist weitgehend aufgeklärt: Im hypotonischen Milieu strömt Wasser entlang dem osmotischen Druckgradienten durch die semipermeable Membran des Erythrozyten. Das Zellvolumen nimmt dadurch zu, der Erythrozyt transformiert sich zum kugelförmigen Sphärozyten, der unter zunehmendem Innendruck steht, bis bei Erreichen eines "kritischen hämolytischen Volumens" die Membran infolge der Überforderung ihrer mechanischen Stabilität einreißt und das Hämoglobin ausströmt. Osmotische Hämolyse ist also ein rein physikalischer Vorgang (23, 26).

Wesentlich komplizierter verläuft die Hämolyse durch oberflächen-aktive Substanzen: Die große Mehrzahl aller amphiphilen Stoffe (Substanzen, deren Moleküle hydrophile und hydrophobe Bereiche aufweisen und die deshalb sowohl in Wasser als auch in Lipiden löslich sind) wirkt in vitro ab einer bestimmten Konzentration hämolytisch (4, 5, 13, 15, 22, 23, 28 bis 38, 43).

Viele sind Medikamente (29, 30, 32, 33). Der Mechanismus dieser Art von Hämolyse ist seit Jahrzehnten Gegenstand intensiver Forschungsarbeit (4, 13, 16, 22, 28 bis 38, 45) mit einer Fülle von Ergebnissen, die jedoch noch nicht zu einer einheitlichen Theorie geführt haben.

REMAN et al. (24) faßten die bisher allgemein anerkannten Erkenntnisse zusammen und teilten den hämolytischen Prozeß in fünf Stadien ein:

1. Absorption des Lysins an die Erythrozytenoberfläche
2. Penetration in die Membran, dadurch
3. Störung der Membranstruktur mit
4. Veränderung der Permeabilität und des osmotischen Äquilibriums, gefolgt von
5. Freisetzung von Hämoglobin

Die meisten neueren Arbeiten beziehen sich auf dieses Schema. Wie die genannten fünf Punkte ursächlich zusammenhängen und durch welche Vorgänge sie im einzelnen charakterisiert sind, ist z.Z. noch Gegenstand kontroverser Diskussion (5, 12, 13, 15, 34, 43, 45).

Es gibt viele Versuche, die oberflächenaktiven Substanzen in bezug auf ihre hämolytische Wirkung in Gruppen zu unterteilen. Allgemein anerkannt ist die Einteilung in spezifische und unspezifische Hämolysine nach SEEMAN (30 bis 33). Die große Gruppe der unspezifischen Hämolysine ist charakterisiert durch den "biphasischen Effekt" (30): In niedrigen (sublytischen) Konzentrationen schützen sie Erythrozyten in vitro vor osmotischer Hämolyse (Stabilisierungsphase). In höheren (lytischen) Konzentrationen bewirken sie selbst Hämolyse (lytische Phase, Destabilisierung). Eine kleine Gruppe von oberflächenaktiven

Substanzen, vor allem die Saponine, zeigt diesen biphasischen Effekt nicht; die Stabilisierungsphase fehlt. Diese Gruppe wird "spezifische Hämolysine" genannt, weil vermutet wird, daß sie spezifisch mit bestimmten Membranbestandteilen (vor allem Cholesterin) reagieren (32).

Problemstellung

Es sollten folgende Fragen geklärt werden:

1. Ist der unspezifische membranprotektive Effekt des HR (7, 11) an einem einfachen Modell nachzuweisen? Als Membranmodell sollten menschliche Erythrozyten verwendet werden, als Schädigungsmodell Hämolyse durch oberflächenaktive Substanzen in vitro. Die Frage war daher: Können menschliche Erythrozyten durch HR vor der hämolytischen Wirkung dieser Substanzen geschützt werden?

Es zeigte sich, daß eine solche Schutzwirkung tatsächlich vorhanden war (s. "Ergebnisse", 2. und 5.). Daraus ergaben sich weitere Fragen:

2. Wie ist der Schutz vor Hämolyse auf molekularer Ebene zu erklären? Insbesondere:

   a) Wird das Hämolysin bereits in der Inkubationslösung durch HR inaktiviert?
   b) Konkurriert HR mit dem Hämolysin um Bindungsstellen an der Membran?

Um dies zu klären, sollten folgende Fragen beantwortet werden:

- Welchen Einfluß hat eine Änderung der Reihenfolge, in der HR, Lysin und Erythrozyten miteinander in Kontakt kommen, auf das Ausmaß der Hämolysehemmung durch HR?

- Wirkt HR selbst hämolytisch?

- Welche Wirkung hat HR auf die osmotische Hämolyse?

- Ist die HR-Wirkung auswaschbar?

- Wird HR durch Erythrozyten gebunden, und wenn ja, in welchem Maße?

- Verändert HR die Erythrozytengestalt?

- Ist der Schutz vor Hämolyse auch bei anderen Spezies nachweisbar, und wenn ja, bestehen quantitative Unterschiede zu menschlichen Erythrozyten?

B. EXPERIMENTELLER TEIL

1. Material und Geräte

1.1 Material

- P B S (phosphate buffered saline) = phosphatgepufferte, isotonische Kochsalzlösung pH 7,4: 150 mM NaCl + 5 mM Natriumphosphat pH 7,4 (Gesamtosmolarität 310 mOsM)

- E r y t h r o z y t e n : Aus menschlichem Frischblut oder aus Konservenblut. Einmal wurde Kaninchenblut verwendet (vgl. Abschnitt C.10). Ca. 50 ml Blut wurden mit 2.500 g_{max} 10 Minuten lang bei 4°C zentrifugiert, Plasma und "buffy coat" (Leukozyten und Thrombozyten) abgesaugt und verworfen. Das verbleibende Erythrozytenkonzentrat wurde dann dreimal mit PBS-Puffer gewaschen: Etwa 20 - 30 ml Erythrozytenkonzentrat wurden in der doppelten Menge auf 4°C gekühltem PBS-Puffer resuspendiert und wieder wie oben zentrifugiert. Dieser Vorgang wurde dreimal wiederholt. Das auf diese Art gewaschene Erythrozytenkonzentrat wurde bei 4°C im Kühlraum aufbewahrt und stets innerhalb von 8 Stunden verbraucht.

- H R wurde freundlicherweise von der Firma Zyma, München, zur Verfügung gestellt. In den meisten Experimenten wurden Venoruton^{R}-Ampullen verwendet (10%ige isotonische wässrige Lösung von HR). Für bestimmte Versuche wurde aus der Trockensubstanz eine 10%ige Lösung in aqua dest. oder PBS zubereitet. Dies ist bei den betreffenden Versuchen angegeben.

Analytische und gaschromatographische Arbeiten ergaben folgende Zusammensetzung der nach der Zyma-internen Vorschrift hergestellten Substanz (27):

7 - 10 % Tetra-5.7.3'.4'-HR
5 - 8 % Tri-5.7.4'-HR
60 - 65 % Tri-7.3'.4'-HR
8 - 12 % Di-7.4'-HR
5 - 8 % Mono-4'-HR

Insgesamt sind 15 Isomere möglich; außerdem ist stets ein geringer Anteil an nicht umgesetztem Rutin und Aglyconen vorhanden (27).

- R a d i o a k t i v m a r k i e r t e s H R wurde von
zur Verfügung gestellt.
Es handelte sich um biologisch mit ^{14}C markiertes HR.
Spezifische Aktivität: 1,035 uCi/mg.

- D i g i t o n i n und D O C von Merck, Darmstadt

- A e s c i n von Madaus, Köln

- C T A B von Sigma, München

- S D S von BioRad, München

- P o l i d o c a n o l als Aethoxysklerol^{R} von Kreussler, Wiesbaden

- C P Z , P r o m e t h a z i n ,
T h i a z i n a m i u m
von Bayer, Leverkusen

- Szintillationsflüssigkeiten:
  Instagel
  Permafluor V

- H_2O_2, 30%ige Lösung

- CO_2-Absorber: Carbo-Sorb

- Verbrennungshütchen mit Zellstoffeinlage

1.2 Geräte

- Zentrifugen: Christ UJ2
  Christ Labofuge II
  Beckman Microfuge B
  Hämatokrit-Zentrifuge

- Spektralphotometer Zeiss MQ3

- Flüssig-Szintillationszähler Packard

- Verbrennungsautomat Packard Sample Oxidizer

- Phasen-Interferenzkontrast-Mikroskop

- Wasserbad mit Thermostat und elektrisch angetriebener rotierender Reagenzglas-Halterung

2. Hämolyse und ihre Hemmung durch HR

Stammsuspension HK5: 0,5 ml des gewaschenen Erythrozytenkonzentrats wurden in 9,5 ml PBS-Puffer suspendiert und so auf einen Hämatokrit von 5 % gebracht. Dies diente als Stammsuspension. Der Hämatokritwert wurde öfter kontrolliert: Aufziehen in heparinisierte Glaskapillaren, 3 Minuten Zentrifugation bei 12.000 RPM, Ablesen des Hämatokritwertes.

Isotonische HR-Lösungen in molaren Konzentrationen: Die Hauptkomponente des HR-Gemisches, Tri-O-(ß-Hydroxyethyl)-rutoside, dominiert mit etwa 65 - 70 % (in der Tabelle bei "Material" sind zwei Isomere angegeben). Sein Molekulargewicht ist 742,70. Die Molekulargewichte der übrigen Komponenten unterscheiden sich hiervon nur geringfügig und streuen etwa zu gleichen Teilen nach oben und unten. Molare Konzentrationsangaben von HR, ausgehend von einem Molekulargewicht von 742,70, waren daher vertretbar. Aus der 10%igen isotonischen Stammlösung wurden durch Verdünnen mit PBS 10^{-1} M, 10^{-2} M, 10^{-3} M und 10^{-4} M isotonische HR-Lösungen, pH 7,4, hergestellt.

Isotonische Lösungen der Hämolysine in molaren Konzentrationen: Aescin, Digitonin, SDS, CTAB, CPZ, Promethazin, Thiazinamium und DOC lagen als trockene Reinsubstanzen vor. Daraus wurden isotonische Lösungen hergestellt. Diese wurden jeweils in Zehnerschritten bis zu benötigten Konzentration mit PBS verdünnt, so daß auch alle Verdünnungen isotonisch waren.

Digitonin war in PBS nicht genügend löslich. Daher wurde eine 10^{-5} M Digitonin-Lösung in 0,5 M Äthanol hergestellt. Duch Kontrollversuche konnte gezeigt wer-

den, daß Äthanol in der verwendeten Konzentration keine eigene hemmende oder fördernde Wirkung auf die Hämolyse besaß.

Polidocanol lag nur als Injektionslösung "Aethoxysklerol 3 %" (Kreussler) vor. Sie enthält 5 Vol% Äthanol. Aus dieser Injektionslösung wurde eine 1%ige isotonische Polidocanol-Stammlösung hergestellt, die dann mit PBS weiter verdünnt wurde. Polidocanol (Hydroxypolyaethoxydodecan) hat laut Merck-Index ein mittleres MG von 600. Zur besseren Vergleichbarkeit mit den übrigen Hämolysinen wurden die %-Konzentrationen in molare Konzentrationen umgerechnet.

2.1 Versuche zu Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen von Hämolysinen und HR

Alle Versuche wurden in Eppendorf-Mikroreaktionsgefäßen durchgeführt. Es wurden stets zuerst die Reaktionslösungen hergestellt (PBS, aqua dest., Hämolysin, HR), immer mit einem Endvolumen von 1.000 ul. Dann wurden 66 ul der Erythrozyten-Stammsuspension HK5 zugegeben, durch mehrmaliges Aufziehen der Pipette vermischt, die Reaktionsgefäße verschlossen und durch vorsichtiges Hin- und Herkippen der Inhalt nochmals durchgemischt. Das Gesamtvolumen pro Versuchsansatz betrug also immer 1.066 ul, der endgültige Hämatokrit 0,3 %. Bei diesem HK wird im Photometer der Gültigkeitsbereich des LAMBERT-BEERschen Gesetzes am besten ausgenutzt: Die Beziehung zwischen Extinktion und Hb-Konzentration ist linear.

Die Inkubationszeit betrug meist 10 oder 30 Minuten und ist bei den einzelnen Experimenten angegeben. Die Inkubation fand stets bei Zimmertemperatur statt. Auch

die verschiedenen Lösungen wurden vor dem Pipettieren auf Zimmertemperatur gebracht. Während der Inkubationszeit wurden die Versuchsansätze mehrmals durch vorsichtiges Hin- und Herkippen durchmischt. Nach Beendigung der Inkubationszeit wurden die Ansätze in einer Beckman Microfuge B fünf Minuten bei 11.000 RPM zentrifugiert, die Überstände abpipettiert und die Absorption des Hb in den Überständen bei 540 nm im Zeiss Spektralphotometer MQ3 gegen Wasser gemessen.

Da HR - wie alle Flavonoide - eine intensiv gelbe Farbe besitzt, wurde die Extinktion verschieden konzentrierter HR-Lösungen bei 540 nm gegen Wasser gemessen. Sie war erst ab etwa 10^{-2} M HR meßbar. Bei Verwendung von HR-Konzentrationen oberhalb dieses Wertes wurde die Eigenextinktion von HR durch Subtraktion der gefundenen Werte von den Meßergebnissen eliminiert.

Jeder Versuch enthielt folgende Kontrollen:

1 x Erythrozyten in 1.000 ul PBS zur Feststellung der Spontanhämolyserate. Diese lag meist bei 3 %. War sie wesentlich höher, wurde der Versuch nicht ausgewertet.

3 x Erythrozyten in 1.000 ul aqua dest. zur Bestimmung der Totalhämolyse. Der Mittelwert aus diesen drei Messungen wurde gleich 100 % gesetzt. Die übrigen Extinktionswerte wurden danach per Dreisatzrechung in %-Hämolyse-Werte umgerechnet.

Die Ergebnisse wurden in Form von Konzentrations-Wirkungs-Kurven (Prozent-Hämolyse-Kurven) ausgewertet. Jeder Versuch wurde mindestens dreimal durchgeführt.

2.1.1 Hämolytische Potenz der Lysine

Neben den genannten Kontrollen wurden Konzentrationsreihen des betreffenden Lysins in die Reaktionsgefäße pipettiert. Reihenfolge: PBS-Lysin-Erythrozytensuspension. Stets isotonische Lösungen, Inkubation 30 Minuten bei Zimmertemperatur.

2.1.2 Hemmung der Hämolyse durch HR

Das Ausmaß der Hämolyseinhibition durch HR wurde auf zweierlei Weise festgestellt:

Einmal wurde die HR-Konzentration konstant gehalten und die Lysinkonzentration variiert, um die Verschiebung der %-Hämolyse-Kurven beobachten zu können. Zum anderen wurde die Lysinkonzentration auf dem H_{50}-Wert, also der Konzentration des Lysins für 50 % Hämolyse nach 30minütiger Inkubation bei Zimmertemperatur, konstant gehalten und die HR-Konzentration in logarithmischer Progression von 10^{-6} M auf 10^{-1} M gesteigert. Beide Versuchstypen wurden im isotonischen Milieu mit 30minütiger Inkubation bei Zimmertemperatur durchgeführt.

2.1.3 HR als nichthämolytische oberflächenaktive Substanz

Die Hämolyserate von Erythrozyten wurde hier ohne Zugabe eines Lysins in Anwesenheit von HR in logarithmisch steigenden Konzentrationen (10^{-6} M bis 10^{-1} M) sowohl im isotonischen als auch im hypotonischen Milieu (für 50 % osmotische Hämolyse) gemessen. Im zweiten Fall wurden rechnerisch isotonische und hyperto-

nische HR-Lösungen verwendet. Die Eigenextinktion von hochkonzentrierten HR-Lösungen bei 540 nm wurde wie oben beschrieben berücksichtigt.

2.1.4 Wirkung von HR auf den biphasischen Effekt unspezifischer Hämolysine im hypotonischen Milieu

Um bei der osmotischen Hämolyse einen reproduzierbaren Hämolysegrad, z.B. 50 %, zu erhalten, muß die Osmolarität der Inkubationslösung in engen Grenzen konstant gehalten werden. Dies wurde erreicht durch Verwendung streng isotonischer Stammlösungen von HR und Lysinen. In einem Vorversuch wurde die osmotische Resistenz der verwendeteten Erythrozytenpopulation bestimmt und möglichst genau die Osmolarität für 50 % Hämolyse ermittelt und als Verhältnis PBS : aqua dest. ausgedrückt. Dieses Verhältnis wurde in dem folgenden eigentlichen Versuch genau eingehalten, indem zuerst die ermittelte Menge aqua dest. in die Reaktionsgefäße pipettiert wurde, dann die ermittelte Menge PBS abzüglich des Volumens der für den jeweiligen Ansatz erforderlichen HR- und Lysin-Lösungen, und zum Schluß HR und Lysin in isotonischen Lösungen.

Da es sich als sehr schwierig erwies, in jedem Fall genau 50 % osmotische Hämolyse als Ausgangsbasis zu erhalten, wurden Werte zwischen 30 % und 70 % akzeptiert und als "relative Hämolyse 1" gesetzt (33). Bei steigenden Lysinkonzentraionen wurde die Hämolyse in Anwesenheit und in Abwesenheit von 2×10^{-2} M HR bestimmt. Die Inkubationszeit betrug 10 Minuten bei Zimmertemperatur.

2.2 Zeitverlauf der Hämolyse

Wie bei den bisher beschriebenen Versuchen war das Endvolumen nach Zugabe der 66 ul Erythrozytensuspension 1.066 ul und der endgültige Hämatokrit in den Versuchsansätzen 0,3 %. Diese Versuchen fanden ebenfalls bei Zimmertemperatur statt.

Reaktionsgefäß war hier jedoch die Meßküvette des Photometers, um den Verlauf gleich von Anfang an beobachten zu können. Meßgröße war hier nicht die Extinktion durch das austretende Hämoglobin, sondern die abnehmende Trübung der Suspension bei fortschreitender Hämolyse.

Zunächst wurde durch Aufnahme von Absorptionsspektren festgestellt, daß bei den verwendeten Versuchsansätzen das Hb immer als Oxy-Hb vorlag. Als Meßwellenlänge wurden daher 700 nm gewählt; die Absorption durch Oxy-Hb ist hier bei dem verwendeten HK von 0,3 % vernachlässigbar klein. Da bei dieser Methode der Gültigkeitsbereich des LAMBERT-BEERschen Gesetzes bei weitem überschritten war, wurde für HK-Werte von 0 bis 0,3 % eine Eichkurve erstellt. Von dieser Eichkurve konnte der Hämolysegrad in % unmittelbar abgelesen werden.

Die Reaktionslösungen (PBS, aqua dest. Lysin, HR) mit einem Endvolumen von 1.000 ul wurden in Eppendorf-Reaktionsgefäßen vorbereitet und für jeden Versuchsansatz in die jeweils frisch gereinigte Glasküvette gegeben. Diese wurde in den Lichtweg des Photometers gestellt. Gleichzeitg mit der Zugabe der 66 ul Erythrozytensuspension HK5 wurde die Stoppuhr in Gang gesetzt, der Versuchsansatz kurz umgerührt und mit der Messung begonnen. Die Extinktion wurde in Minutenabständen abgelesen, maximal 10 bis 12 Minuten lang.

Wiederingangsetzen der HR-gehemmten Digitonin-Hämolyse

Wie eben beschrieben, wurde die Digitonin-Hämolyse durch HR gehemmt und der zeitliche Verlauf der Reaktion aufgezeichnet. Digitonin-Konzentration 3 x 10^{-6} M, HR-Konzentration 3 x 10^{-3} M. Nach 5 Minuten wurde die Digitonin-Konzentration durch Zugabe von 30 ul 10^{-4} M Digitonin-Lösung auf 6 x 10^{-6} M erhöht und der Ablauf der Reaktion wie beschrieben weiter verfolgt.

2.3 Hämolyse-Experimente mit Vorinkubation

Vor dem Start der Hämolyse-Reaktion wurden die Reaktionspartner, und zwar entweder

HR + Lysin oder

HR + Erythrozyten

für unterschiedliche Zeiten vorinkubiert. Dann wurde mit einer der beschriebenen Methoden der durch HR erreichbare Hämolyseschutz gemessen, also als Konzentrations-Wirkungs-Beziehung von HR oder Lysin oder als Zeitverlauf der Hämolyse.

Die im Abschnitt "Ergebnisse 6." vorgestellten Versuche wurden wie folgt durchgeführt:

2.3.1 Vorinkubation HR und Aescin

Aus einer Reihe von Versuchsansätzen, die alle 5 x 10^{-4} M HR (Endkonzentration) enthielten, wurden Dreiergruppen gebildet. Diese Dreiergruppen erhielten in bestimmten Zeitabständen 1,5, 2 und 2,5 x 10^{-6} M Aescin. Der Zeitpunkt der Aescin-Zugabe wurde notiert. Zum Schluß wurde in allen Versuchansätzen gleichzeitig (d.h. so schnell wie möglich hintereinander)

mit der Zugabe der Erythrozytensuspension die Hämolyse gestartet. Die Vorinkubationszeiten waren in dem vorgestellten Beispiel 99, 49, 23, 10 und 2 Minuten.

Der Hämolyseversuch wurde wie unter 2.1 beschrieben durchgeführt. Endvolumen 1.066 ul, HK 0,3 %, 30 Minuten Inkubation bei Zimmertemperatur, Zentrifugation, Extinktionsmessung in den Überständen bei 540 nm, Umrechnung in % Hämolyse. Die graphische Auswertung erfolgte dann als % Hämolyse versus Dauer des HR-Aescin-Kontaktes vor dem Start der Hämolyse (s. Abb. 12).

2.3.2 Effekt der Reihenfolge, in der Erythrozyten und Lysin pipettiert werden (ohne HR)

Für Digitonin, Aescin und SDS wurden, wie unter 2.1 beschrieben, Konzentrations-Wirkungs-Kurven erstellt. Dabei wurde einmal wie in Abb. 7 die Reihenfolge PBS-Lysin-Erythrozyten eingehalten, und in einem zweiten Versuch mit jeweils der gleichen Erythrozytensuspension die Reihenfolge PBS-Erythrozyten-Lysin, die Hämolyse also mit Zugabe des Lysins gestartet. Inkubation jeweils 30 Minuten bei Zimmertemperatur.

2.3.3 Vorinkubation HR + Digitonin und HR + Erythrozyten

Variable war hier die HR-Konzentration. Die Digitonin-Konzentration war stets 2×10^{-6} M. Je zwei Ansätze mit gleicher HR-Konzentration wurden in folgender Reihenfolge pipettiert:

	Vorinkubation der Reaktionspartner		Start der Hämolyse mit		Inkubation der Hämolyse
I	PBS-HR-Digitonin	30'	Erythrozyten	30'	Zentrifuge
II	PBS-HR-Erythrozyten	15'	Digitonin	30'	

Der eigentliche Hämolyse-Versuch wurde wie unter 2.1 beschrieben ausgeführt: Endvolumen 1.066 ul, HK 0,3 %, 30 Minuten Inkubation bei Zimmertemperatur, Zentrifugation, Extinktionsmessung in den Überständen bei 540 nm, Umrechnung in % Hämolyse. Die graphische Auswertung erfolgte dann als KonzentrationsWirkungs-Kurven für HR (s. Abb. 13).

2.3.4 Vorinkubation HR + SDS und HR + Erythrozyten

Die Hämolyse wurde in ihrem zeitlichen Ablauf verfolgt (s. 2.2). SDS 1,8 x 10^{-4} M, HR 10^{-2} M, Vorinkubationszeit 2 Minuten. Die Ansätze wurden wie folgt pipettiert:

			Start der Hämolyse mit
I	PBS-HR-SDS	2'	Erythrozyten
II	PBS-HR-Erythrozyten	2'	SDS

Als Kontrollen ohne HR dienten:

		Start der Hämolyse mit
I PBS-SDS	2'	Erythrozyten
II PBS-Erythrozyten	2'	SDS

Gegen Ende der Vorinkubationszeit wurden die Ansätze in die Meßküvette gegeben und die Hämolyse mit Erythrozyten oder SDS gestartet. Der Zeitverlauf der Hämolyse wurde verfolgt wie unter 2.2 beschrieben.

2.4 Auswaschbarkeit der HR-Wirkung

Für diesen Versuch wurde Frischblut verwendet. Es wurde deplasmatisiert und gewaschen wie unter 1.1 beschrieben. Anschließend wurden in 4 Reagenzgläsern Erythrozytensuspensionen mit einem HK von 5 % hergestellt, zwei davon ("0") wie unter 2. beschrieben, also: 9,5 ml PBS + 0,5 ml Erythrozytenkonzentrat. Die beiden anderen Reagenzgläser ("HR") erhielten zusätzlich 10^{-3} M HR: 8,5 ml PBS + 1,0 ml 10^{-2} M HR-Lösung, isotonisch, + 0,5 ml Erythrozytenkonzentrat. Die Reagenzgläser wurden mit Plastikstöpseln verschlossen und im auf 37°C geheizten Wasserbad rotierend inkubiert. Ein Paar "0" und "HR" wurde nach 30 Minuten entnommen, das zweite nach 2 Stunden.

Sofort nach der Entnahme wurde der Flüssigkeitsspiegel an den Reagenzgläsern markiert und die Suspension bei 4.000 RPM in einer Christ Labofuge II fünf Minuten lang

zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert, die Reagenzgläser wieder bis zum Markierungsstrich mit PBS aufgefüllt, der Inhalt vermischt und erneut zentrifugiert. Dieser Vorgang wurde dreimal wiederholt, so daß im Überstand der "HR"-Suspension keine nennenswerte Menge HR mehr vorhanden sein konnte. Die "0"-Suspension wurde aus Gründen der Vergleichbarkeit genauso behandelt. Mit den beiden Suspensionen "0" und "HR" wurden dann, wie unter 2.1 beschrieben, Konzentrations-Wirkungs-Kurven für Aescin erstellt.

3. Bindung von HR durch Erythrozyten

3.1 Mit photometrischer Bestimmung von HR im Überstand in Anlehnung an SEEMAN und WEINSTEIN (30)

Zunächst mußte eine geeignete Meßwellenlänge gefunden werden, bei der HR eine hohe und Hb eine möglichst niedrige Absorption zeigt. Dazu wurden Absorptionsspektren von HR und Hb aufgenommen. Eine Wellenlänge von 350 nm erschien am geeignetsten (s.a. 27).

- Erythrozytensuspension HK10: 9 ml PBS + 1 ml Erythrozytenkonzentrat

- 5 x 10^{-5} M und 1 x 10^{-4} M isotonische HR-Stammlösung aus Venoruton^{R}-Ampullen

Versuch I (endgültiger HK 0,6 %)

In Eppendorf-Reaktionsgefäßen wurden drei verschiedene Ansätze hergestellt, jeder in vierfacher Ausfertigung:

1. 1.000 ul PBS + 66 ul Erythrozytensuspension HK 10 %
2. 1.000 ul 5 x 10^{-5} M HR + 66 ul Erythrozytensuspension HK 10 %
3. 1.000 ul 5 x 10^{-5} M HR + 66 ul PBS

Diese Ansätze wurden 35 Minuten lang bei 37°C im rotierenden Wasserbad inkubiert, dann in einer Beckman Microfuge B fünf Minuten lang bei 11.000 RPM zentrifugiert und die Absorption der Überstände bei 350 nm im Zeiss Spektralphotometer MQ3 gegen Wasser gemessen.

Versuch II (endgültiger HK 5 %)

In Eppendorf-Reaktionsgefäßen wurden drei verschiedene Ansätze hergestellt, jeder in doppelter Ausfertigung:

1. 500 ul PBS + 500 ul Erythrozytensuspension HK 10 %
2. 500 ul 10^{-4} M HR + 500 ul Erythrozytensuspension HK 10 %
3. 1.000 ul 5 x 10^{-5} M HR

Weiter wie bei Versuch I.

3.2 Bestimmung von ^{14}C-markiertem HR

3.2.1 Szintillationsspektroskopie nach Entfärbung

Probevolumen war stets 50 ul (Überstand oder Sediment). Da diese Proben stark gefärbt waren (HR, Hb) und diese Färbung das Meßergebnis verfälscht hätte, mußten die Proben mit H_2O_2 entfärbt werden. Da die Proben zudem zelluläre Elemente (Erythrozyten) mit Lipidmembranen enthielten, mußten diese erst solubilisiert werden (Lösung A: Soluene 100; Lösung B ist der eigentliche

Szintillator). Die Szintillationsgefäße (Plastikfläschchen mit Schraubdeckel, Volumen 20 ml) erhielten daher in dieser Reihenfolge:

1. 50 ul Probe
2. 0,5 ml H_2O_2 30%ig
3. 1,5 ml Lösung A

30 Minuten Pause für Entfärbung und Solubilisierung

4. 15 ml Lösung B (Szintillator)

Der Inhalt der Plastikfläschchen wurde durch kräftiges Schütteln intensiv vermischt, anschließend wurden die Bestimmungsansätze über Nacht im Kühlraum (4°C) stehen gelassen und am nächsten Tag ihre Aktivität im Packard Flüssig-Szintillationszähler gemessen (Zähldauer 10 Minuten).

Der Zähler druckt als Ergebnis "counts per minute" (CPM) aus. Aus diesem Meßwert wird anhand einer Eichkurve ("Quenchkurve") die tatsächliche Aktivität in "desintegrations per minute" (DPM) ermittelt.

3.2.2 Bestimmung von $^{14}CO_2$ nach Verbrennung der Proben

Mit der Verbrennungsmethode können Störfaktoren wie Färbung, Trübung, unterschiedliche chemische Zusammensetzung der Proben (Hb, Membranlipide etc.) vollständig ausgeschaltet werden. Darüber hinaus ist das Probevolumen stärker variabel.

Funktion: Das Gerät verbrennt die Proben durch Erhitzen mit einem Heizdraht und Zufuhr von O_2. Die Verbrennungsgase werden durch einen CO_2-Absorber (Carbo-Sorb) geleitet, der das entstandene CO_2 - und damit

auch das $^{14}CO_2$ - quantitativ abfängt. Das Gerät gibt dann den CO_2-Absorber im eingestellten Verhältnis (hier 6 : 15) mit dem Szintillator Permafluor V in Szintillationsgefäße, die unmittelbar in den Szintillationszähler gegeben werden können.

Vorgehen:

- Probevolumina von 50 - 1.000 ul wurden in Verbrennungshütchen aus Zellulose gegeben. Diese enthielten Zellstoffeinlagen zum Aufsaugen der Proben. Wenn nach dem Auftropfen der Proben noch Reste in der Pipettenspitze verblieben waren, wurde diese mit Wasser nachgespült, bis die Aufnahmefähigkeit der Zellstoffeinlagen erschöpft war.
- Trocknen im Trockenschrank bei 70°C
- Verbrennung im Packard-Sample-Oxidizer

3.2.3 Versuchsansätze

Es wurde ausschließlich menschliches Frischblut verwendet. Für jeden Versuch wurden mehrere Eppendorf-Mikroreaktionsgefäße mit je 500 ul Erythrozytenkonzentrat und 500 ul ^{14}C-HR-Lösung gefüllt, verschlossen und bei 37°C rotierend im Wasserbad inkubiert. Nach Ende der jeweils genau festgehaltenen Inkubationszeit wurden die Suspensionen um einen Faktor 11.000 verdünnt:

1. Das Mikroreaktionsgefäß wurde geöffnet und in ein großes Zentrifugenglas gelegt. Dann wurden 55 ml PBS zugegeben, das Mikroreaktionsgefäß darin ausgespült und entfernt.
2. Zentrifugation 10 Minuten bei 4.500 RPM (Christ UJ2)
3. Abpipettieren von 50 ml Überstand. Es verblieben also 6 ml Überstand + Sediment im Zentrifugenglas.

Dadurch wurde sichergestellt, daß nicht versehentlich Erythrozyten mit abpipettiert wurden. Der Verdünnungsfaktor der ursprünglichen ^{14}C-HR-Lösung war somit 1 : 110 (0,5 ml : 55 ml).

4. Auffüllen mit 50 ml PBS, Zentrifugation und Abpipettieren von 50 ml Überstand: Verdünnungsfaktor 1 : 10
5. Wiederholung von 4.: Verdünnungsfaktor 1 : 10
6. Abpipettieren des gesamten Überstandes und Entnahme der Proben aus dem Sediment

Der Gesamtverdünnungsfaktor der ursprünglichen ^{14}C-HR-Lösung war also 110 x 10 x 10 = 11.000. Die Aktivität von 0,5 ul 10^{-3} M ^{14}C-HR-Lösung war ca. 53.000 CPM (Kontrollbestimmung). Die 11.000fach verdünnte Lösung müßte also eine Aktivität von ca. 5 CPM besitzen. Das liegt weit unter der Nachweisbarkeitsgrenze (das "Hintergrundrauschen" des Szintillationsverfahrens beträgt 20 - 30 CPM). Durch diese Methode wurde also gewährleistet, daß die gemessene Aktivität im Sediment tatsächlich an die Erythrozyten gebunden war.

Zu Abb. 16: ^{14}C-HR-Konzentration bei der Inkubation: 10^{-3} M, Inkubationszeit: 3 Stunden.
Nach der 3. Verdünnung wurden je drei 50 ul-Proben aus dem Überstand und aus dem Sediment entnommen. Da dieser Versuch gleichzeitig dazu dienen sollten, die Suffizienz der beschriebenen Verdünnungsmethode zu prüfen, wurde auch nach der 1. und 2. Verdünnung je eine 50 ul-Probe aus Überstand und Sediment entnommen. Weiteres Vorgehen und Aktivitätsmessung siehe 3.2.1 (Entfärbungs-Verfahren).

Zu Abb. 17: ^{14}C-HR-Konzentration bei der Inkubation: 10^{-3} M und 10^{-4} M, Inkubationszeit: 30, 105, 180 und 240 Minuten.

Nach Ablauf dieser Inkubationszeit wurde je ein Ansatz mit 10^{-3} und 10^{-4} M ^{14}C-HR aus dem Wasserbad genommen und verdünnt wie beschrieben. Nach der 3. Verdünnung wurden je drei 50 ul-Proben aus dem Sediment entnommen. Weiteres Vorgehen siehe 3.2.2 (Verbrennungsmethode).

Zu Abb. 18: ^{14}C-HR-Konzentration bei der Inkubation: 10^{-3} M, Inkubationszeit 10, 30, 85 und 145 Minuten.

Nach der 3. Verdünnung und Abpipettieren des Überstandes wurde das Sediment in 2 ml PBS resuspendiert. Dann wurden nacheinander drei Zellstoffeinlagen für Verbrennungshütchen in das Zentrifugenglas geworfen. Nachdem diese sich mit der Suspension vollgesogen hatten, wurden sie mit einer Pinzette entnommen und in Verbrennungshütchen gegeben. Zwei Zellstoffeinlagen reichten aus, um die Suspension aufzusaugen, mit der dritten wurde das Zentrifugenglas ausgewischt. Auf diese Weise konnten die gesam-ten eingesetzten Erythrozyten (500 ul Erythrozytenkonzentrat) zur Aktivitätsmessung herangezogen werden. Weiteres Vorgehen siehe 3.2.2 (Verbrennungsmethode).

Auswertung: Die drei zusammengehörigen Aktivitätswerte für jeden Ansatz wurden addiert.

Zu Abb. 19: ^{14}C-HR-Konzentration bei der Inkubation: 10^{-3} M, Inkubationszeit 30 und 120 Minuten.

Nach der 3. Verdünnung und Abpipettieren des Überstandes Entnahme von 50 ul-Proben zur Aktivitätsbestimmung (Verbrennungsmethode).

Das restliche Sediment wurde hämolysiert:

- Ein Mikroreaktionsgefäß enthielt 1.000 ul aqua dest. Dazu wurden 50 ul Erythrozytenkonzentrat aus dem Sediment gegeben.
- 5 Minuten stehen lassen, dabei mehrmals intensive Durchmischung mit dem Rüttler.
- Zentrifugation in einer Beckman Microfuge B 2 x 5 Minuten bei 11.000 RPM.

Dieser Versuch wurde für jede Inkubationszeit (30 und 120 Minuten) in vierfacher Ausfertigung durchgeführt. Der Überstand wurde jeweils in ein Verbrennungshütchen mit zwei Zellstoffeinlagen dekantiert. Das Sediment (Erythrozytenschatten) wurde in 500 ul aqua dest. resuspendiert und ebenfalls in ein Verbrennungshütchen mit Zellstoffeinlage dekantiert. Mit einer zweiten Zellstoffeinlage wurde das Mikroreaktionsgefäß ausgewischt, um keine Aktivität zu verlieren.

Die Verbrennungshütchen enthielten also folgende Proben, je für 30 und 120 Minuten Inkubationszeit:

4 x 50 ul Sediment (Gesamtaktivität)
4 x Überstand aus der Hämolyse von 50 ul Sediment
4 x Sediment aus der Hämolyse von 50 ul Sediment

Weiteres Vorgehen siehe 3.2.2 (Verbrennungsmethode).

4. Erythrozytengestalt

Alle Versuche wurden in Eppendorf-Mikroreaktionsgefäßen angesetzt. Endvolumen 1.000 ul, endgültiger HK 5 %. Dafür wurde eine Stammsuspension HK 10 % angefertigt (9 ml PBS + 1 ml Erythrozytenkonzentrat).

Jeder Ansatz erhielt 500 ul Stammsuspension HK 10 % und 500 ul PBS (Kontrolle) oder isotonische HR-Lösungen für Endkonzentrationen von 5×10^{-5} M bis 5×10^{-2} M. Diese Ansätze wurden unter gelegentlichem Mischen durch vorsichtiges Hin- und Herkippen 30 Minuten bei Zimmertemperatur inkubiert und dann wie folgt mikroskopisch untersucht:

5 ul von jedem Ansatz wurden auf ein Deckglas gegeben, dieses vorsichtig umgedreht und auf einem Gummiring, ø 1 cm, gelegt, der seinerseits auf einem Objektträger lag. Dieses Vorgehen ("hängender Tropfen") war notwendig, weil bei der üblichen Methode die Erythrozyten zwischen Objektträger und Deckglas bereits in den Kontrollansätzen ohne HR vollständig in Echinozyten umgewandelt waren ("Deckglaseffekt", s.a. 23).

Anschließend wurden die Erythrozyten mit dem Normalobjektiv betrachtet und ihre Gestalt nach FUJI et al. (9) beurteilt. Dabei wurde die Scharfeinstellung etwa auf die Mitte des hängenden Tropfens fokussiert, weil an den Grenzflächen zwischen Flüssigkeit und Luft bzw. Glas Artefakte (Deckglaseffekt, s.o.) auftreten können.

C. ERGEBNISSE

1. Hämolyse durch oberflächenaktive Substanzen im isotonischen Milieu

Zur Auslösung der Hämolyse wurden chemisch möglichst verschiedene Substanzen verwendet. Abb. 2 gibt einen Überblick über die Strukturformeln der neun ausgewählten Hämolysine. Sie entstammen den Gruppen der Saponine, der Gallensäuren, der Phenothiazine und der anionischen, kationischen und nichtionischen Tenside. Polidocanol wurde ausgewählt, weil es von FELIX (6) auch zur Erzeugung experimenteller Ödeme verwendet wurde, die übrigen, weil sie von vielen Autoren als Prototypen der jeweiligen Substanzgruppe zur Erzeugung von Hämolyse benutzt wurden und ihre Wirkung daher gut untersucht ist.

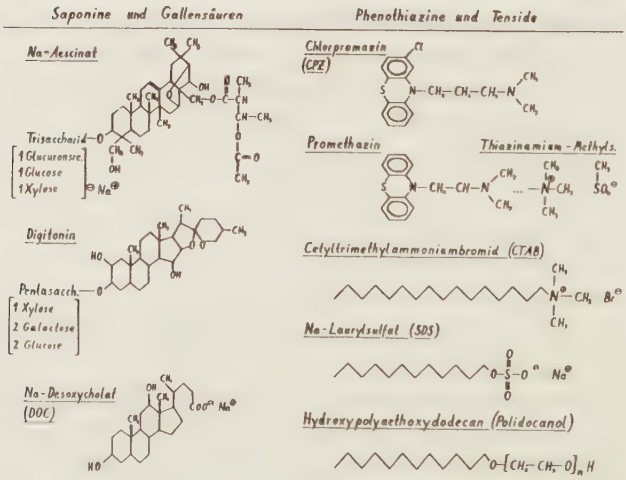


Abb. 2: Strukturformeln der verwendeten Hämolysine

Wie die chemische Struktur, so unterschied sich auch die hämolytische Potenz der neun ausgewählten Hämolysine sehr stark. Sie wurde definiert als H_{50} (Konzentration eines Hämolysins für 50 % Hämolyse) und erstreckte sich über einen Bereich von 2×10^{-6} M für Aescin und Digitonin bis 1×10^{-2} M für Thiazinamium. Abb. 3 zeigt eine Zusammenschau in Form von Konzentrations-Wirkungs-Kurven.

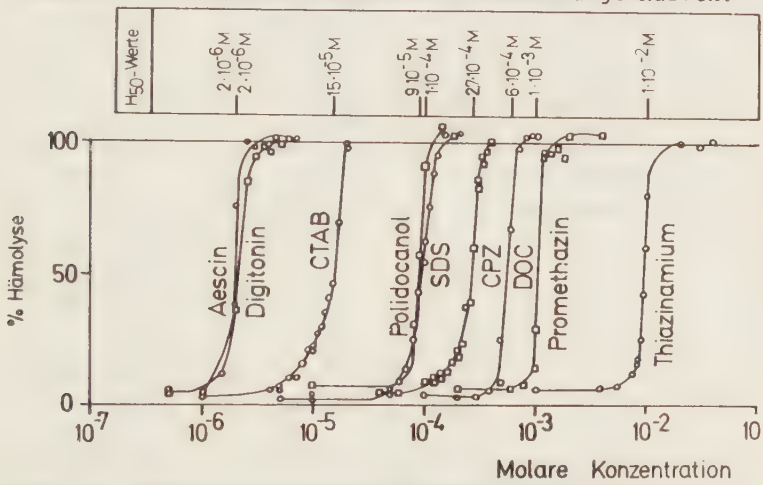


Abb. 3: Hämolyse durch oberflächenaktive Substanzen im isotonischen Milieu (PBS)
HK 0,3 %, Inkubationszeit 30 Minuten bei Zimmertemperatur
Die graphisch ermittelten H_{50}-Werte sind in den Kasten über den Kurven eingetragen.

2. Hemmung der Hämolyse durch HR

Es zeigte sich, daß die hämolytische Wirksamkeit aller verwendeten Substanzen durch HR gehemmt werden konnte. Zunächst wurden die Konzentrationen der Hämolysine so eingestellt, daß sie etwa 50 % Hämolyse verursachten (H_{50}): relative Hämolyse 1. Steigende Konzentrationen von HR bewirkten eine Abnahme der Hämolyse in jedem Fall bis auf "Null", d.h. bis zur Spontanhämolyserate der jeweils verwendeten Erythrozytenpopulation.

Abb. 4 zeigt dies in Form von Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen mit der HR-Konzentration als Variable.

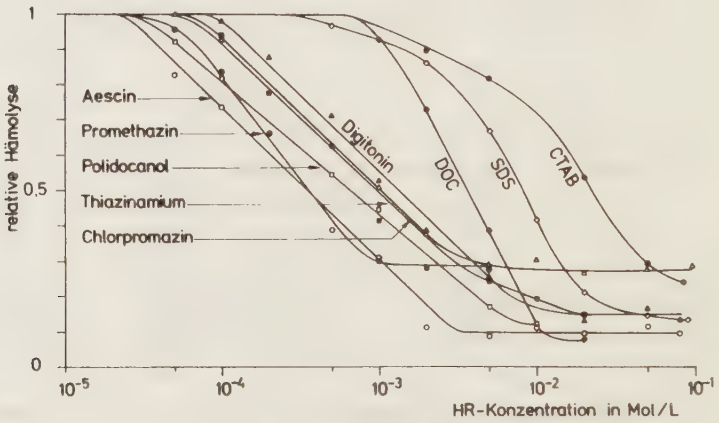


Abb. 4: Hemmwirkung des HR auf die Hämolyse durch oberflächenaktive Substanzen
"Relative Hämolyse 1" steht für "50 % Ausgangshämolyse", die nicht immer genau eingehalten werden konnte und zur Vergleichbarkeit der HR-Effekte einen gemeinsamen Bezugspunkt nötig machte.
HK 0,3 %, Inkubation 30 Minuten bei Zimmertemperatur, isotonisches Milieu (PBS). Jeder Punkt repräsentiert einen Mittelwert aus 2 - 3 Versuchen.

Die protektive Wirkung des HR gegen die Hämolyse war am stärksten ausgeprägt bei den Saponinen, den Phenothiazinen und Polidocanol, deutlich schwächer bei Desoxycholat und SDS, und am schwächsten bei CTAB. Als Maß für die Schutzwirkung des HR wurde diejenige HR-Konzentration gewählt, die die etwa 50 % Ausgangshämolyse um weitere 50 % senkte. Diese Konzentration wurde AH_{50} genannt für "50 % Antihämolyse". Die Werte sind in Tabelle I aufgeführt (Spalte b), zusammen mit den H_{50}-Werten der Hämolysine (Spalte a).

Tabelle I

Die Hämolysine sind geordnet nach abnehmender hämolytischer Potenz, die durch die H_{50}-Werte (Spalte a) ausgedrückt wird.

Nr.	Hämolysin	a) H_{50} der Hämolysine in Mol/Liter	b) AH_{50} des HR in Mol/Liter	c) Zahlenverhältnis der Moleküle Hämolysin : HR	d) Verschiebungsfaktor
1	Digitonin	2×10^{-6}	7×10^{-4}	1 : 350	
2	Aescin	2×10^{-6}	3×10^{-4}	1 : 150	5*
3	CTAB	$1{,}5 \times 10^{-5}$	2×10^{-2}	1 : 1.333	2
4	Polidocanol	9×10^{-5}	9×10^{-4}	1 : 10	2
5	SDS	1×10^{-4}	7×10^{-3}	1 : 70	2
6	CPZ	$2{,}7 \times 10^{-4}$	$7{,}5 \times 10^{-4}$	1 : 3	14
7	DOC	6×10^{-4}	$3{,}5 \times 10^{-3}$	1 : 6	2
8	Promethazin	1×10^{-3}	$2{,}6 \times 10^{-4}$	4 : 1	17
9	Thiazinamium	1×10^{-2}	6×10^{-4}	17 : 1	4

a) Konzentration des Hämolysins für 50 % Hämolyse
HK 0,3 %, Inkubation 30 Minuten bei Zimmertemperatur
Die Werte sind aus Abb. 3 entnommen.

b) HR-Konzentration für 50 % Inhibition der Hämolyse, die durch die H_{50}-Konzentration des Hämolysins erreicht wurde.
HK 0,3 %, Inkubation 30 Minuten bei Zimmertemperatur
Die Werte sind aus Abb. 4 entnommen.

c) Zahlenverhältnis der Moleküle Hämolysin und HR bei der AH_{50}.

d) Quotient aus den Hämolysinkonzentrationen in Anwesenheit und in Abwesenheit von 2×10^{-2} M HR an dem Punkt, an dem die biphasischen Kurven die relative Hämolyse 1 wieder erreichen.
Weitere Informationen s. Abb. 7.

* Der Effekt von Aescin und Digitonin im hypotonischen Milieu wurde nicht untersucht (keine Stabilisierungsphase, da spezifische Hämolyse!). Der angegebene Wert stammt von Abb. 5 und gibt den Verschiebungsfaktor bei 50 % Hämolyse wieder (isotonisches Milieu, aber gleiche HR-Konzentration und Inkubationszeit wie bei Abb. 7).

Es wurde auch untersucht, wie HR die Konzentrations-Wirkungs-Kurven der Hämolysine verändert. Abb. 5 zeigt den Effekt am Beispiel der Aescin-Hämolyse. 2×10^{-2} M HR erhöhten die H_{50} des Aescin um einen Faktor 5 (s.a. Tabelle I, Spalte d). Es handelte sich deutlich um eine Parallelverschiebung; die 100 %-Wirkung (vollständige Hämolyse) wurde auch in Anwesenheit des Inhibitors wieder erreicht. Dieses Verhalten deutet auf einen kompetitiven Mechanismus hin. Ähnliche Kurven wurden auch für die übrigen Hämolysine erhalten.

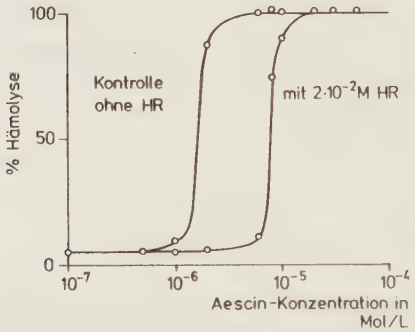


Abb. 5: Verschiebung der Aescin-Hämolyse-Kurve durch 2×10^{-2} M HR
HK 0,3 %, Inkubation 10 Minuten bei Zimmertemperatur, isotonisches Milieu (PBS)

3. HR als nichthämolytische oberflächenaktive Substanz

HR ist wie die Hämolysine eine oberflächenaktive Substanz. Seine kritische micellare Konzentration (CMC) liegt bei ca. 10^{-3} M. Bei dieser Konzentration setzt es die Oberflächenspannung des Wassers auf ca. 60 dyn/cm herab (21).

In den bisher beschriebenen Versuchen zeigte HR neben seiner inhibitorischen Wirkung keine eigene hämolytische Aktivität (s. Abb. 4). Trotzdem war es inter-

essant zu wissen, was geschieht, wenn HR allein mit Erythrozyten inkubiert wird. Das Ergebnis ist in Abb. 6 zu sehen: Im isotonischen Milieu (untere "Kurve") war innerhalb des untersuchten Konzentrationsbereichs von 10^{-6} M bis 10^{-1} M HR keinerlei Hämolyse zu beobachten. Da in diesem Versuch die Inkubationszeit nur 10 Minuten betrug, wurde er mit einer Inkubationszeit von 30 Minuten wiederholt. Das Ergebnis war das gleiche (ohne Abb.). Spätere Versuche mit HR-Konzentrationen von 10^{-4} M und 10^{-3} M und Inkubationszeiten von 1, 2 und 4 Stunden zeigten ebenfalls keine Hämolyse (ohne Abb.).

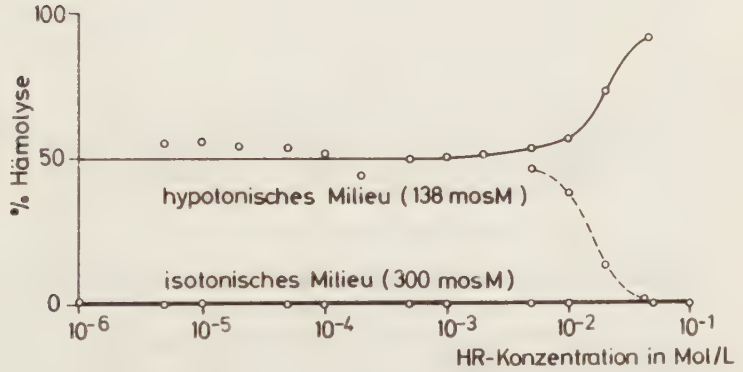


Abb. 6: HR als nichthämolytische oberflächenaktive Substanz, Einfluß auf die osmotische Hämolyse
HK je 0,3 %, Inkubation 10 Minuten bei Zimmertemperatur
Untere "Kurve" (an der Nullinie): HR wirkt nicht hämolytisch im isotonischen Milieu.
Obere, durchgezogene Kurve: Hypotonische Hämolyse, Steigerung durch rechnerisch isotonische HR-Lösungen
Gestrichelte Kurve: Hypotonische Hämolyse, Verringerung durch HR in isotonischem Puffer

Im hypotonischen Milieu, das so eingestellt war, daß ohne HR 50 % der Erythrozyten hämolysierten, waren die Ergebnisse abhängig von der Zubereitung der HR-Stammlösung: Eine rechnerisch isotonische HR-Lösung, wie sie auch in allen anderen Experimenten verwendet wurde, zeigte einen Anstieg der hypotonischen Hämolyse bei hohen Konzentrationen (durchgezogene Linie). Eine Lösung, bei der die HR-Substanz einfach dem isotonischen Puffer zugegeben wurde, rief eine Abnahme der Hämolyse hervor (gestrichelte Linie). Dieses Verhalten konnte leicht durch physikochemische Vorgänge in der Lösung erklärt werden (s. "Diskussion") und ergab keinen Hinweis auf eigene hämolytische Eigenschaften von HR.

4. Wirkung von HR auf den biphasischen Effekt unspezifischer Hämolysine im hypotonischen Milieu

Für die Frage nach dem Wirkmechanismus des HR war es interessant festzustellen, ob HR nur die Hämolyse beeinflußt oder auch andere Wirkungen der Lysine, wie die Stabilisierung von Erythrozyten gegen osmotische Hämolyse durch die Gruppe der "unspezifischen Hämolysine" (s. Einleitung). Es wurde daher jeweils die Wirkung eines Hämolysins in einer hypotonischen Lösung, die auf etwa 50 % Hämolyse eingestellt war, in Anwesenheit und in Abwesenheit einer stets gleichen Konzentration von HR (2×10^{-2} M) untersucht. Abb. 7 zeigt die Ergebnisse, die bei den unspezifischen Hämolysinen Polidocanol, Chlorpromazin und Desoxycholat erhalten wurden.

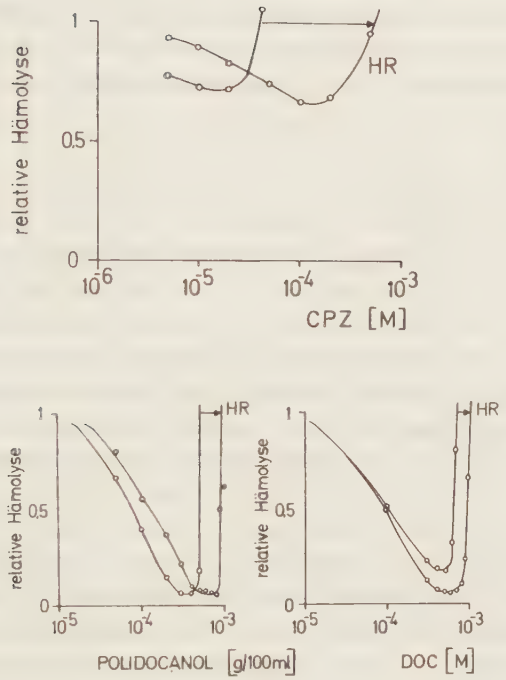


Abb. 7: Biphasischer Effekt unspezifischer Hämolysine auf die hypotonische Hämolyse in Abwesenheit und in Anwesenheit von HR
"Relative Hämolyse 1" bedeutet: "Osmotische Hämolyse ca. 50 %, in Abwesenheit des Hämolysins". Die Pfeile repräsentieren den "Verschiebungsfaktor" (weitere Erklärungen im Text).
HK 0,3 %, Inkubation 10 Minuten bei Zimmertemperatur
HR stets 2 x 10^{-2} M

Im Falle des Polidocanol war die ganze Kurve, Stabilisierungsphase und lytische Phase, durch HR nach rechts verschoben. Das gleiche Verhalten wurde für SDS und Thiazinamium festgestellt (ohne Abb.). Im Falle des Chlorpromazin war das gleiche zu beobachten, nur daß hier die Rechtsverschiebung weitaus stärker war. Eine ähnliche Kurve ergab sich für Promethazin (ohne Abb.).

Eine Ausnahme vom Verhalten der anderen Lysine war im Falle des Desoxycholat zu beobachten: Die Stabilisierungsphase wurde durch HR nicht verändert. Variationen der HR-Konzentration und der Inkubationszeit brachten dasselbe qualitative Ergebnis.

Verschiebungsfaktoren

Da alle soeben beschriebenen Versuche mit der gleichen HR-Konzentration, nämlich 2×10^{-2} M HR, durchgeführt wurden, bot sich ein zweiter Maßstab (neben der AH_{50}) für die HR-Wirkung an: Die Parallelverschiebung des lytischen Teils der biphasischen Kurven, ausgedrückt als Verschiebungsfaktor = Quotient aus der Lysin-Konzentration in Abwesenheit und in Anwesenheit von 2×10^{-2} M HR an dem Punkt, wo die Kurve die "relative Hämolyse 1" wieder erreicht (Pfeile in Abb. 7). Diese Zahl bedeutet also: "Faktor, mit dem die Lysin-Konzentration in Abwesenheit von HR multipliziert werden muß, um in Anwesenheit von 2×10^{-2} M HR wieder den gleichen Effekt zu erreichen". Diese "Verschiebungsfaktoren" sind wieder in Tabelle I angegeben (Spalte d). Im Gegensatz zu den AH_{50}-Werten heben die Verschiebungsfaktoren die Phenothiazine Chlorpromazin und Promethazin deutlich aus den übrigen Hämoysinen heraus: Ihre Konzentrations-Wirkungs-Kurven wurden durch HR besonders weit verschoben.

5. Zeitlicher Verlauf der Hämolyse mit und ohne HR

Es wurde eine Methode ausgearbeitet, den Ablauf der Hämolyse in der Meßküvette des Photometers direkt zu verfolgen (s. "Methoden" 2.2). Ähnliche Methoden sind bei BONSALL und HUNT (4), CHO und PROULX (5) sowie bei SEEGER (28) beschrieben.

Der Ablauf der Hämolyse durch Aescin, Digitonin, DOC, SDS, CTAB und Polidocanol sowie der osmotischen Hämolyse wurde je über einen Zeitraum von 10 Minuten verfolgt. Jedes Hämolysin wurde in mehreren Konzentrationen getestet (die osmotische Hämolyse in mehreren Osmolaritäten).

Es ergaben sich erhebliche Unterschiede in den "Kurvencharakteristiken" der einzelnen Hämolysine und der osmotischen Hämolyse. Sie sind in Abb. 8 gegenübergestellt.

Bei der osmotischen (hypotonischen) Hämolyse fällt die kurze lag-Phase auf, die für jede Osmolarität gleich lang war. Die Hämolyse verlief sehr schnell, der endgültige Hämolysegrad war spätestens nach einer Minute erreicht.

Der osmotischen Hämolyse im zeitlichen Verlauf sehr ähnlich war die SDS-Hämolyse mit dem Unterschied, daß die Kurve bei höheren SDS-Konzentrationen im beobachteten Zeitraum kein Plateau erreichte.

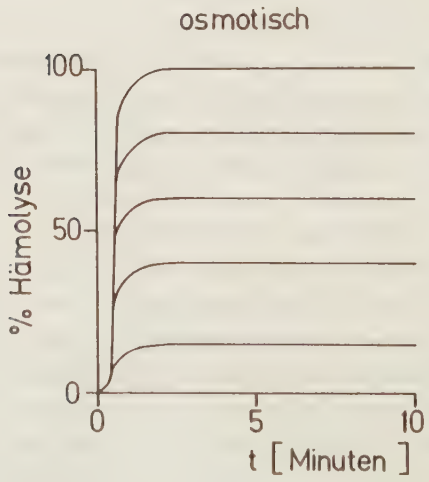
Auch die CTAB-Hämolyse war der osmotischen ähnlich, der für SDS angegebene Unterschied war hier aber noch stärker ausgeprägt; die Hämolyse kam auch bei geringeren Konzentrationen des Hämolysins im beobachteten Zeitraum nicht zum Stillstand. Man könnte also von einer initialen ("Aufstrich" der Kurve) und sekundären (nach dem "Knick" in der Kurve) Hämolyse sprechen.

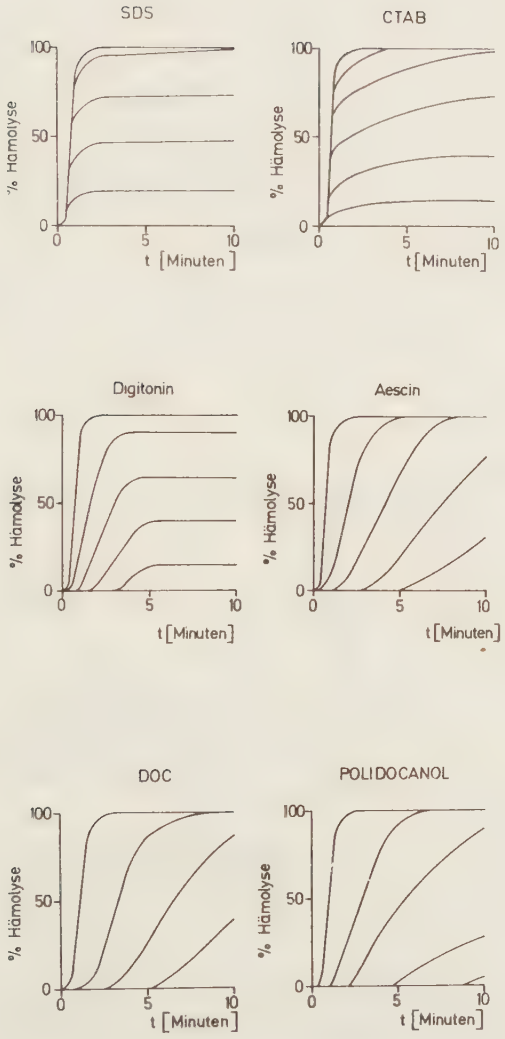
Ganz anders verlief die Hämolyse bei den übrigen Lysinen. Hier waren die lag-Phase und die Steilheit der Kurven von der Hämolysin-Konzentration abhängig: Je höher das Hämoysin konzentriert war, desto kürzer war die lag-Phase und desto steiler die Kurve. Jedoch ergaben sich auch hier charakteristische Unterschiede:

Bei Digitonin waren innerhalb des beobachteten Zeitraums "endgültige Hämolysegrade" zu erreichen, bei Aescin und DOC nicht. In diesen Fällen verliefen die Kurven sigmoid.

Im Falle des Polidocanol war wie bei Aescin und DOC im beobachteten Zeitraum kein Endpunkt der Hämolyse kleiner 100 % zu sehen, die Kurven nahmen aber einen eher logarithmischen Verlauf mit plötzlichem Beginn nach erheblichen lag-Phasen.

Abb. 8 a - g: Zeitverlauf der Hämolyse durch sechs verschiedene Hämolysine und - zum Vergleich - der osmotischen Hämolyse
Die unterschiedlichen Kurven repräsentieren den Hämolyseverlauf bei verschiedenen Konzentrationen der Lysine bzw. bei verschiedenen osmotischen Drücken.
HK 0,3 %, isotonisches Milieu (PBS), Testvolumen 1 ml (Meßküvette), Zimmertemperatur
Meßpunkte wurden aus Gründen der Übersichtlichkeit weggelassen.




SDS
CTAB
Digitonin
Aescin
DOC
POLIDOCANOL
% Hämolyse
100
50
0
0
5
10
t [Minuten]

Durch Zugabe von HR in verschiedenen Konzentrationen wurde die Hämolyse wie erwartet gehemmt, die Kurvencharakteristik änderte sich jedoch nicht. Die resultierenden Kurven sahen in allen Fällen genauso aus wie die, welche durch Verringerung der Hämolysin-Konzentration erreicht werden konnten (ein Beispiel ist in Abb. 9 dargestellt). Besonders deutlich wird dies, wenn man die Kurven graphisch differenziert (s. Abb. 10). Das Differential drückt aus, wie viele Erythrozyten zu jedem Zeitpunkt gerade hämolysieren.

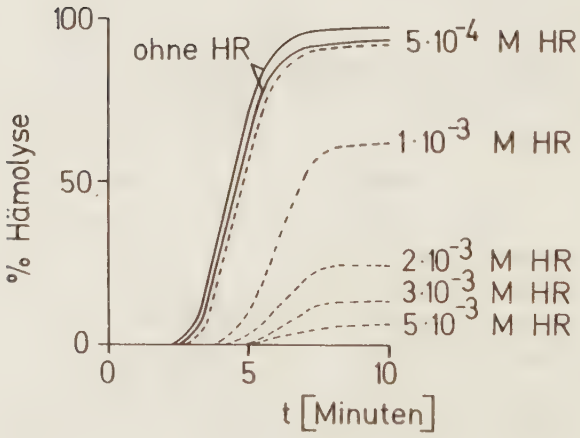


Abb. 9: Zeitverlauf der Digitonin-Hämolyse in Abwesenheit (durchgezogene Linien) und in Anwesenheit steigender Konzentrationen von HR (gestrichelte Linien)
HK 0,3 %, isotonisches Milieu (PBS), Testvolumen 1 ml (Meßküvette), Zimmertemperatur, Digitonin-Konzentration je 2,5 x 10^{-6} M

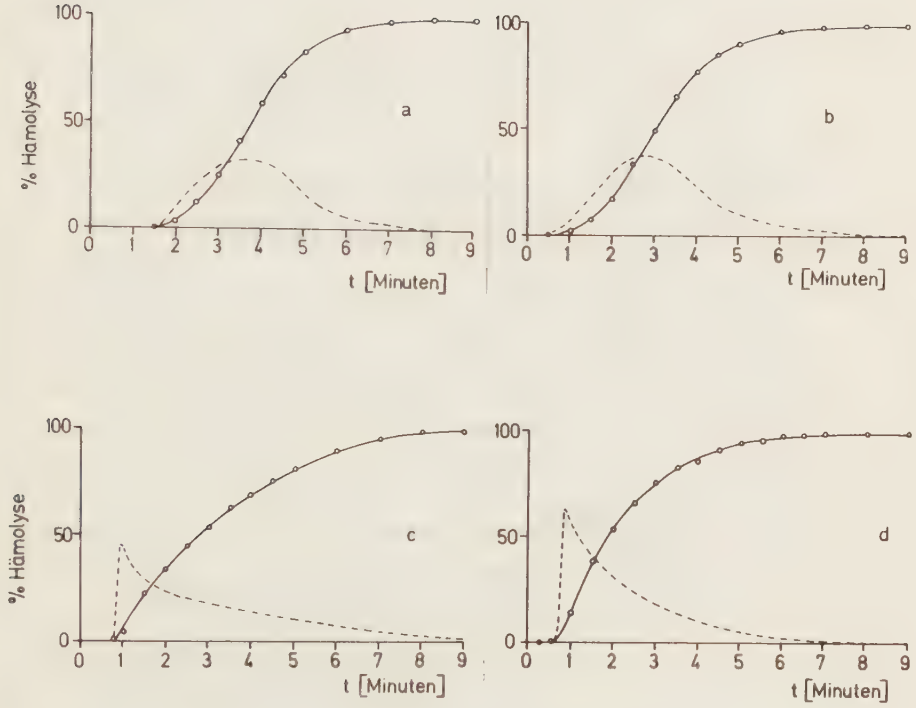


Abb. 10: Zeitverlauf der Hämolyse durch Polidocanol und Aescin (durchgezogene Linien) und graphisch bestimmtes Differential dieser Kurven (gestrichelte Linien)
a) Aescin 6×10^{-6} M
b) Aescin 1×10^{-5} M + HR 2×10^{-3} M
c) Polidocanol 6×10^{-3} g/100 ml
d) Polidocanol 7×10^{-3} g/100 ml + HR 2×10^{-3} M
HK 0,3 %, isotonisches Milieu (PBS), Testvolumen 1 ml (Meßküvette), Zimmertemperatur

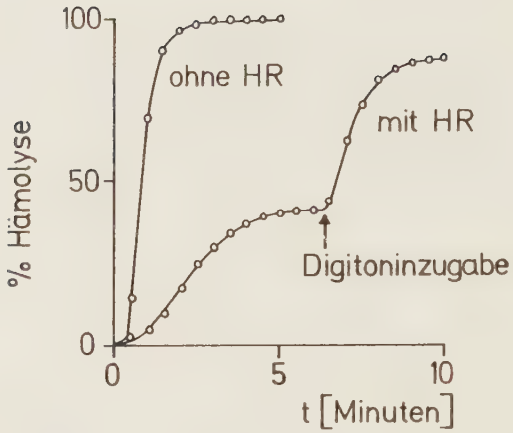


Abb. 11: Effekt nachträglicher Erhöhung der Digitonin-Konzentration bei HR-gehemmter Digitonin-Hämolyse
links ("ohne HR"): Hämolyse durch 3×10^{-6} M Digitonin
rechts ("mit HR"): Hämolyse durch 3×10^{-6} M Digitonin, gehemmt durch 3×10^{-3} M HR
Pfeil: Erhöhung der Digitonin-Konzentration auf 6×10^{-6} M
HK 0,3 %, isotonisches Milieu (PBS), Testvolumen 1 ml (Meßküvette), Zimmertemperatur

Da die Parallelverschiebung der Konzentrations-Wirkungs-Kurven der Hämolysine durch HR (s. Abb. 5) ein formales Kriterium für einen kompetitiven Mechanismus darstellt, sollte auch im zeitlichen Verlauf der Hämolyse ein solches formales Kriterium geprüft werden: Durch nachträgliche Zugabe von Hämolysin müßte der Schutzeffekt aufgehoben werden. Abb. 11 zeigt den Effekt einer nachträglichen Erhöhung der Digitonin-Kon-

zentration auf die bereits durch HR gehemmte Digitonin-Hämolyse: Die nach 6 Minuten zum Stillstand gekommene Hämolyse wurde prompt wieder in Gang gesetzt. Der Schutzeffekt des HR war also durch Erhöhung der Digitonin-Konzentration wieder aufhebbar.

6. Hämolyse-Experimente mit Vorinkubation der Reaktionspartner

Diese Versuche wurden durchgeführt, um Aufschluß über den Wirkmechanismus der Hämolysehemmung durch HR zu erlangen. Nach PONDER (23) und anderen Autoren (5, 37) muß dabei zunächst die Frage geklärt werden, ob der Inhibitor mit dem Lysin in der Lösung reagiert (sog. "chemischer Antagonismus") oder mit den Erythrozyten. Diese Frage ist nach den zitierten Autoren beantwortbar, indem man einmal das Lysin und einmal die Erythrozyten mit dem Inhibitor vorinkubiert (Näheres s. "Diskussion").

Dafür gibt es verschiedene Methoden:

1. Vorinkubation Inhibitor + Lysin
   (Variable: Vorinkubationszeit)
2. Vorinkubation Inhibitor + Erythrozyten
   (Variable: Vorinkubationszeit)
3. Vergleich beider Vorinkubationstypen
   (Variable: Konzentration von Inhibitor oder Lysin bzw. Zeitverlauf der Hämolyse)

Für SDS, Aescin und Digitonin wurden Versuche mit allen drei Methoden durchgeführt.

In den Abbildungen 12, 13 und 14 sind drei typische Ergebnisse dargestellt.

Abb. 12 zeigt die HR-gehemmte Aescin-Hämolyse in Abhängigkeit von der Dauer der Vorinkubation HR + Aescin. Die Hämolyse wird mit zunehmender Kontaktzeit HR + Aescin vor der Zugabe der Erythrozytensuspension nicht stärker gehemmt; sie nimmt sogar etwas zu. Für Digitonin und SDS ergaben sich ähnliche Kurven. Auch hier bewirkte eine längere Vorinkubation von HR und Lysin keinen gesteigerten Schutz vor Hämolyse.

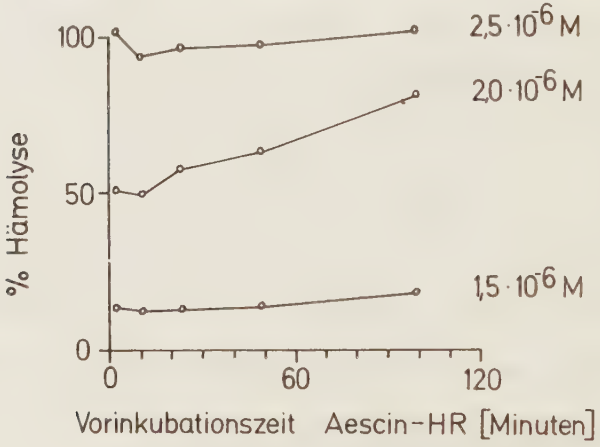


Abb. 12: Vorinkubation von Aescin und HR bei drei verschiedenen Aescin-Konzentrationen (Diese sind rechts neben den Kurven angegeben.)
Abszisse: Vorinkubationszeit = Zeitdauer des HR-Aescin-Kontaktes vor dem Start der Hämolyse
HK 0,3 %, Inkubation 30 Minuten bei Zimmertemperatur, isotonisches Milieu (PBS), Testvolumen 1 ml
HR-Konzentration: 5×10^{-4} M

Abb. 13 zeigt am Beispiel der Digitonin-Hämolyse eine Gegenüberstellung. HR wurde einmal mit dem Digitonin und einmal mit den Erythrozyten vorinkubiert. Dabei zeigte sich, daß auch ohne HR die Hämolyse erheblich geringer ausfiel, wenn Digitonin vor den Erythrozyten in den Reaktionsgefäßen war (Abb. 13 a: 30 % Hämolyse statt 95 %).

Dieses Phänomen trat bei allen untersuchten Hämolysinen auf und konnte in gesonderten Versuchen auf eine Anlagerung der Lysin-Moleküle an die hydrophobe Plastikwand der Eppendorf-Reaktionsgefäße zurückgeführt werden.

In Abb. 13 b wurde versucht, diesen Störeffekt rechnerisch zu eliminieren. Die beiden Ausgangswerte für die Versuche I und II wurden gleich 1 gesetzt und das Ergebnis wie schon weiter vorne beschrieben als "relative Hämolyse" ausgedrückt. Nach dieser Korrektur war die Schutzwirkung des HR bei beiden Vorinkubationsarten etwa gleich stark ausgeprägt.

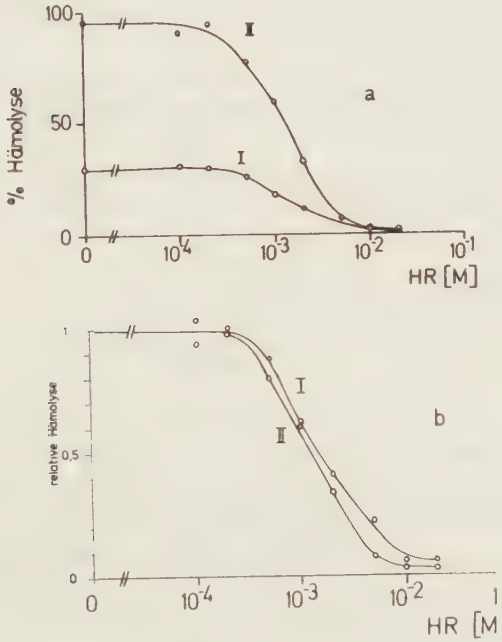


Abb. 13 a und b:
Hemmung der Digitonin-Hämolyse nach Vorinkubation von
I HR + Digitonin 30 Minuten
II HR + Erythrozyten 15 Minuten
HK 0,3 %, Inkubationszeit 30 Minuten bei Zimmertemperatur, isotonisches Milieu (PBS), Testvolumen 1 ml

Auch bei dem in Abb. 14 dargestellten Versuch - SDS-Hämolyse im zeitlichen Verlauf - war die Wirkung des HR etwa gleich stark, wenn es statt mit SDS mit den Erythrozyten vorinkubiert wurde (symbolisiert durch die senkrechten Pfeile).

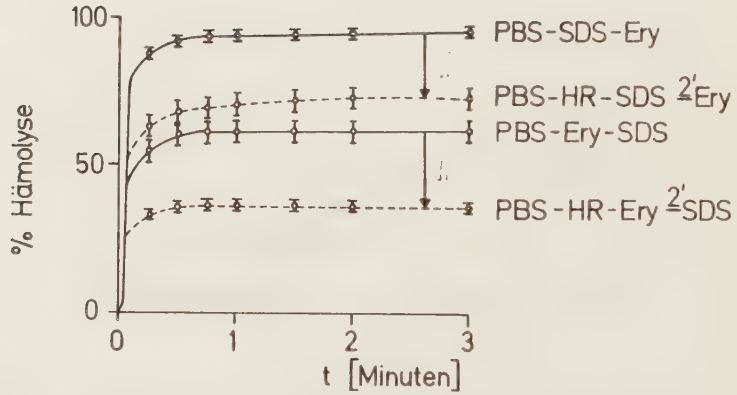


Abb. 14: Hemmung der SDS-Hämolyse durch HR nach Vorinkubation von

I	HR + SDS	2 Minuten
II	HR + Erythrozyten	2 Minuten

Die Reihenfolge, in der die Reaktionspartner pipettiert wurden, ist rechts neben den Kurven angegeben.
HK 0,3 %, isotonisches Milieu (PBS), Testvolumen 1 ml (Meßküvette), Zimmertemperatur
SDS-Konzentration jeweils $1{,}8 \times 10^{-4}$ M, HR-Konzentration jeweils 1×10^{-2} M
Die Punkte stellen jeweils Mittelwerte aus 2 Versuchen dar.

7. Auswaschbarkeit des HR-Effekts

Falls die antihämolytische Wirkung von HR von einer festeren Bindung des HR-Moleküls an den Erythrozyten begleitet ist, müßte sie auch nach Auswaschen des HR aus der Suspensionslösung - zumindest teilweise - erhalten bleiben. Dies sollte geprüft werden durch eine Reihe von Versuchen, in denen Erythrozyten mit HR vorinkubiert und das HR anschließend wieder ausgewaschen wurde. Die so vorbehandelten Erythrozyten wurden dann für Hämolyseexperimente mit Aescin verwendet und mit Kontrollerythrozyten aus dem gleichen Erythrozytenkonzentrat verglichen, die vorher nicht mit HR in Kontakt waren, ansonsten aber völlig gleich behandelt wurden.

Folgende Einflußgrößen wurden variiert:

- Erythrozyten: Konservenblut/Frischblut/Kaninchenblut
- HR-Konzentration bei der Vorinkubation: 10^{-4} M bis 10^{-2} M
- Temperatur bei der Vorinkubation: Zimmertemperatur/37°C
- Dauer der Vorinkubation: 30 Minuten bis 4 Stunden
- Auswaschen nach der Vorinkubation: 1 x/ 2 x/ 3 x/ 4 x

Unter keiner dieser Bedingungen konnte ein Unterschied zwischen HR-vorinkubierten Erythrozyten und Kontrollerythrozyten gefunden werden. Ihre Aescin-Empfindlichkeit war immer gleich. Der HR-Effekt war also auswaschbar (Experimente nicht dargestellt).

8. Bindung von HR durch Erythrozyten

8.1 Photometrische Bestimmung von HR nach Inkubation mit Erythrozyten

HR wurde analog der von SEEMAN und WEINSTEIN (30) für Phenothiazine beschriebenen Methode mit Erythrozyten inkubiert und seine Absorption nach Zentrifugation bei der für geeignet befundenen Wellenlänge von 350 nm im Überstand gemessen. Die gefundenen Extinktionswerte wurden mit denen einer Kontrollösung verglichen.

Diese Experimente wurden für verschiedene HR-Konzentrationen und HK-Werte ausgeführt. Abb. 15 zeigt das Ergebnis für eine HR-Konzentration von 5 x 10^{-5} M und HK-Werte von 0,6 % und 5 %.

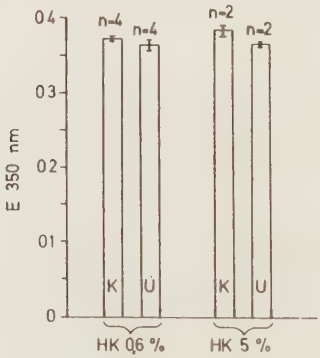


Abb. 15: Bindung von HR an Erythrozyten - photometrische Methode
In zwei Versuchen (HK einmal 0,6 %, links, und einmal 5 %, rechts) wurden Erythrozyten mit HR inkubiert und zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert und seine Extinktion bei 250 nm gegen H_2O gemessen (Ü). Links neben den Meßwerten (bereinigt um die Hb-Extinktion) ist - als Kontrolle - die Extinktion der jeweils verwendeten HR-Lösung dargestellt (K).
HK 0,6 % und 5 %, isotonisches Milieu (PBS), Inkubation 25 Minuten bei Zimmertemperatur

Nach Inkubation mit Erythrozyten war die HR-Konzentration im Überstand stets geringfügig vermindert, was auf eine Bindung von HR durch die Erythrozyten schließen läßt.

8.2 Bestimmung von ^{14}C-markiertem HR nach Inkubation mit Erythrozyten

Nach dreistündiger Inkubation von Erythrozyten (HK 50 %) mit 10^{-3} M ^{14}C-HR und anschließendem Auswaschen des ^{14}C-HR war an den Erythrozyten noch eine Aktivität von etwa 560 DPM pro ul Erythrozytenkonzentrat zu finden (Abb. 16). Diese Aktivität blieb nach dem 1., 2. und 3. Waschvorgang gleich (Abb. 16, "S" für Sediment). Die Aktivität im Überstand dagegen nahm entsprechend den Verdünnungsfaktoren ab, wie zu erwarten war (Abb. 16, "Ü" für Überstand). Daraus war zu ersehen, daß die im Sediment verbliebene Aktivität tatsächlich an die Erythrozyten gebunden war.

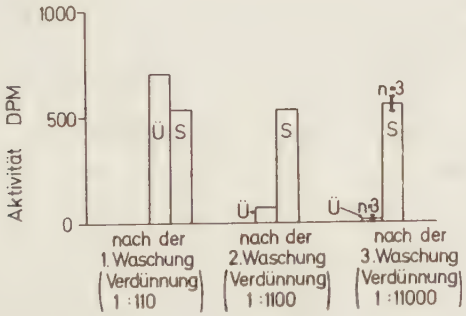


Abb. 16: Bindung von HR an Erythrozyten: Aktivität in Überstand und Sediment
Ü = 50 ul Überstand, S = 50 ul Sediment
^{14}C-HR-Konzentration 10^{-3} M, HK 50 %, Inkubationszeit 3 Stunden bei 37°C, Instagel-Verfahren

Als nächstes wurde untersucht, in welcher Weise diese an die Erythrozyten gebundene Aktivität von der Inkubationsdauer abhängt. Abb. 17 und 18 zeigen die Ergebnisse für unterschiedliche Methoden (s. 3.2.3).
Abb. 17 gibt die Aktivität in 50 ul Erythrozytenkonzentrat an, Abb. 18 in 500 ul. Die Ergebnisse stimmen gut überein, wenn man den Faktor 10 im Probevolumen beachtet.

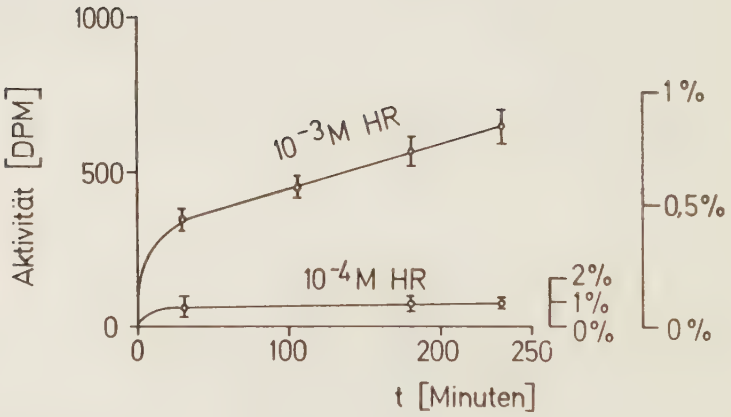


Abb. 17: Bindung von HR an Erythrozyten: Aktivität im Sediment nach unterschiedlich langer Inkubation der Erythrozyten mit ^{14}C-markiertem HR HK 50 %, isotonisches Milieu (PBS), Inkubation bei 37°C, Inkubationszeit siehe Abszisse, ^{14}C-HR-Konzentration 10^{-3} M (obere Kurve) und 10^{-4} M (untere Kurve), Verbrennungsmethode, Probevolumen 50 ul
Die beiden zusätzlichen Ordinaten rechts geben den gebundenen Prozentanteil an der gesamten eingesetzten HR-Menge wieder. Jeder Kurvenpunkt repräsentiert einen Mittelwert aus 3 Bestimmungen.

Abb. 17 zeigt den Verlauf der Bindungskurven für zwei um einen Faktor 10 verschiedene ^{14}C-HR-Konzentrationen während der Inkubation: 10^{-3} M und 10^{-4} M.

Interessanterweise war auch die Aktivität in den Sedimenten nach jeweils gleicher Inkubationszeit etwa um einen Faktor 10 verschieden. Es wurde also von den beiden unterschiedlich konzentrierten ^{14}C-HR-Lösungen jeweils der gleiche Prozentanteil durch die jeweils gleiche Erythrozytenmenge gebunden. Die gesamte eingesetzte Aktivität wurde gemessen (sie betrug 774.340 DPM), so daß der gebundene Prozentanteil errechnet werden konnte. Er ist in Abb. 17 an den zusätzlichen Ordinaten rechts neben den beiden Kurven abzulesen. Nach 3 Stunden Inkubationszeit war jeweils etwa 1 % der eingesetzten Gesamtaktivität an Erythrozyten gebunden.

Ein zweiter interessanter Befund ist der Verlauf der Kurven: Einem steilen Anstieg folgt ab etwa 30 Minuten Inkubationszeit eine flachere, nahezu lineare Zunahme der gebundenen Aktivität.

Dieser Befund wird in Abb. 18 bestätigt. Sie enthält einen Meßpunkt für nur 10 Minuten Inkubationszeit, der erwartungsgemäß bereits im stärker gekrümmten Teil der Kurve liegt. Abb. 18 enthält ebenfalls eine zusätzliche Ordinate für den Prozentanteil der gebundenen Aktivität an der eingesetzten Gesamtaktivität. Die gestrichelten Linien in Abb. 18 sind ein Versuch, das Zustandekommen der Kurve zu erklären (s. Diskussion).

Die nächste Frage war die nach dem Bindungsort des ^{14}C-HR am Erythrozyten: Membran oder Zytoplasma? Dazu wurden die mit ^{14}C-HR inkubierten Erythrozyten hämolysiert und die Aktivität im Überstand (Zytoplasma) und im Sediment (Membranen und Zytoplasmareste) gemes-

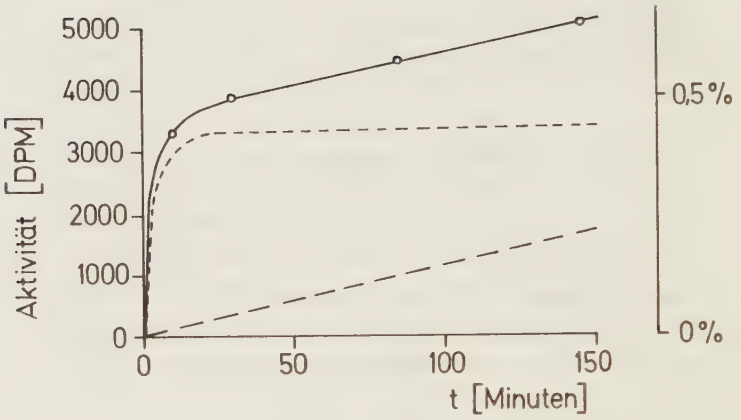


Abb. 18: Bindung von HR an Erythrozyten: Aktivität im Sediment nach unterschiedlich langer Inkubation der Erythrozyten mit ^{14}C-markiertem HR Alle Versuchsbedingungen wie in Abb. 17, jedoch Probevolumen 500 ul. ^{14}C-HR-Konz. 10^{-3} M. Die gestrichelten Kurven sind ein Versuch, das Zustandekommen der Kurven zu erklären (s. Diskussion).

sen. Das Ergebnis ist in Abb. 19 dargestellt. Die Aktivität im Sediment war um ein Vielfaches (etwa um einen Faktor 10) geringer als die Aktivität im Überstand.

Aber auch die im Sediment gefundene Aktivität war nicht (jedenfalls nicht überwiegend) an Erythrozytenmembranen gebunden: Aus methodischen Gründen (s. 3.2.3) enthielt das "Sediment" noch einen erheblichen Anteil an Überstand, da es nicht möglich war, diesen zu dekantieren,

ohne die leicht beweglichen Membranen mit abzukippen. Die hier gemessene Aktivität (Abb. 19 c) muß daher als Aktivität dieses "Rest-Überstandes" betrachtet werden. Die eigentlichen Erythrozytenmembranen hatten demzufolge keinerlei Aktivität gebunden, die dreimaliges Auswaschen überdauert hätte.

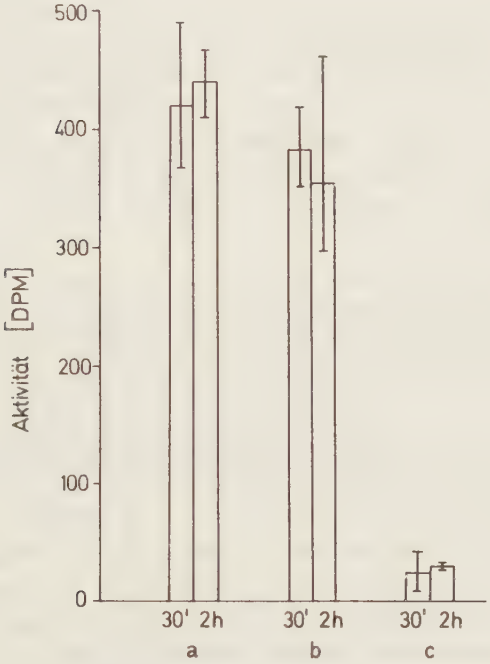


Abb. 19 a, b, c:
a) Bindung von HR an Erythrozyten: Aktivität in 50 ul Sediment nach Inkubation der Erythrozyten (HK 50 %) für 30 Minuten bzw. 2 Stunden mit 10^{-3} M HR bei 37°C, Zentrifugation und dreimaligem Waschen
b) Aktivität im Überstand nach osmotischer Totalhämolyse der Erythrozyten aus a
c) Aktivität im Sediment nach osmotischer Totalhämolyse der Erythrozyten aus b
Jeder Balken repräsentiert einen Mittelwert aus 4 Messungen.

8.3 Antihämolytische Wirksamkeit von HR nach Inkubation mit Erythrozyten

Es sollte untersucht werden, ob HR, nachdem es schon einmal mit Erythrozyten in Kontakt war, noch die gleiche antihämolytische Wirkung besitzt.

Eine 10^{-2} M HR-Lösung wurde mit Erythrozyten (HK 10 %) 10 Minuten inkubiert. Nach Zentrifugation wurde der Überstand für Hämolyseexperimente mit Polidocanol als Hämolysin verwendet und das Ergebnis mit dem für eine gleichkonzentrierte, nicht mit Erythrozyten vorinkubierte HR-Lösung verglichen. Es wurde sowohl die HR- als auch die Lysin-Konzentration variiert.

In jedem Fall hatte der Überstand nach Vorinkubation die gleiche antihämolytische Wirksamkeit wie die HR-Vergleichslösung.

9. Änderung der Erythrozytengestalt durch HR

Nach 30minütiger Inkubation mit HR zeigten sich in Abhängigkeit von der HR-Konzentration zunehmend echinozytäre Formen. Der Punkt, an dem das Zahlenverhältnis normale Erythrozyten (Discozyten) : Stechapfelformen (Echinozyten) 1 : 1 erreicht hatte, lag bei etwa 10^{-3} M HR. Abb. 20 zeigt ein Verteilungsdiagramm für die beiden Formen. Auffallend ist, daß die Echinozyten mit steigender HR-Konzentration nicht an Volumen zunahmen, das Stadium I der Externalisation (= Echinozytenbildung) nach FUJII et al. (9) also nicht überschritten war. Näheres siehe Diskussion.

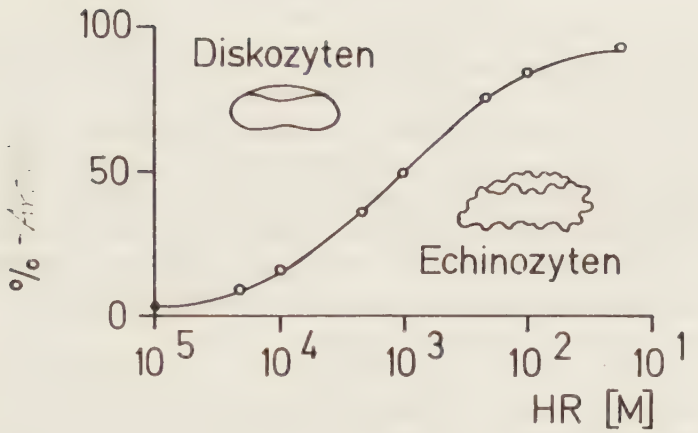


Abb. 20: Gestaltveränderungen von Erythrozyten nach 30minütiger Inkubation in verschieden konzentrierten isotonischen HR-Lösungen bei Zimmertemperatur
Methode des "hängenden Tropfens"
Die Verteilungskurve gibt das Ergebnis einer Abschätzung des Zahlenverhältnisses zwischen veränderten und unveränderten Erythrozyten wieder.

10. (Anhang) Inhibitorische Wirkung von HR auf die Hämolyse von Kaninchenerythrozyten

Alle bisher beschriebenen Versuche wurden mit menschlichen Erythrozyten durchgeführt. An Kaninchenerythrozyten wurde die Empfindlichkeit gegen Aescin, die osmotische Resistenz und die Wirkung von HR auf die Aescin-Hämolyse und die hypotonische Hämolyse sowie die Auswaschbarkeit des HR-Effekts untersucht. Der HR-Effekt war in allen genannten Punkten der gleiche wie bei menschlichen Erythrozyten, und zwar qualitativ wie quantitativ.

D. DISKUSSION

1. Wertung der gefundenen Hämolyseinhibition durch HR

In der vorliegenden Arbeit wird eine neue Wirkung des Flavonoid-Derivats HR vorgestellt (Vorabveröffentlichungen aus Aktualitätsgründen: 2, 3): HR hemmt die durch oberflächenaktive Substanzen hervorgerufene Hämolyse. Es wurden neun für ihre hämolytische Eigenschaft bekannte Substanzen getestet; in jedem Falle konnte die Hämolyse vollständig gehemmt werden.

Besondere Beachtung verdient dabei die große chemische Verschiedenheit der verwendeten Hämolysine. Es kommen lange aliphatische Ketten vor, aromatische und nichtaromatische Ringsysteme, Anionen, Kationen und nichtionische Substanzen (s. Abb. 2). Hier Gemeinsamkeiten in den chemischen Eigenschaften zu finden, fällt sehr schwer, wenn man einmal von den amphiphilen Löslichkeitseigenschaften aller Hämolysine absieht.

Die Hemmwirkung des HR war nicht bei allen Hämolysinen gleich stark. In Tabelle I ist sie in zwei verschiedenen Maßstäben angegeben: als AH_{50} und als Verschiebungsfaktor (Spalten b, d). Für die AH_{50}-Werte wurde außerdem das Zahlenverhältnis der Moleküle Hämolysin für 50 % Hämolyse zu den Molekülen HR für 50 % Hemmung errechnet (Spalte c). Vergleicht man diese Maßstäbe für die inhibitorische Wirkung des HR mit der hämolytischen Potenz der Hämolysine (Spalte a), so stellt man fest, daß im Falle der Verschiebungsfaktoren keine Korrelation möglich ist, und im Falle der AH_{50} nur dann, wenn man die Hämolysine willkürlich in drei Gruppen einteilt:

1. stark wirkende Hämolysine:
   Aescin, Digitonin, CTAB
2. mittelstark wirkende Hämolysine:
   Polidocanol, SDS, CPZ, DOC
3. schwach wirkende Hämolysine:
   Promethazin und Thiazinamium

Hier ist die Feststellung möglich, daß stark wirkende Hämolysine mehr HR zur Inhibition der Hämolyse benötigen als mittelstark wirkende und diese wieder mehr als die schwach wirkenden.

Ein Vergleich mit bereits bekannten Hämolyseinhibitoren zeigt die Sonderstellung des HR:

SEGAL et al. (37) untersuchten die inhibitorische Wirkung des nichthämolytischen Saponins Glycyrrhizin auf die Hämolyse durch verschiedene Saponine, Sapogenine und ein kationisches Detergens. In jener Arbeit wurde die Hemmwirkung des Inhibitors genauso wie in der vorliegenden als AH_{50} ausgedrückt. Die Ergebnisse sind also vergleichbar:

Tabelle II

Hämolysin	AH_{50} von Glycyrrhizin (aus 17)	AH_{50} von HR (aus Tab. I)	Glycyrrhizin zu HR
Digitonin	$2{,}4 \times 10^{-3}$ M	7×10^{-4} M	3,4
Aescin	$> 4{,}5 \times 10^{-3}$ M	3×10^{-4} M	> 15

Gemessen an der AH_{50}-Konzentration wirkte HR gegen die Digitonin-Hämolyse dreimal so stark und gegen die Aescin-Hämolyse mehr als fünfzehnmal so stark wie Glycyrrhizin.

CHO und PROULX (5) untersuchten die inhibitorische Wirkung von Plasma- und isolierten Membranbestandteilen auf die Hämolyse durch Lysolecithine, Acylcarnitine und Acylcholine. Auch diese Autoren drücken die Wirkung des Inhibitors als AH_{50} aus, allerdings bei 100 % Ausgangshämolyse anstatt 50 %. Die AH_{50}-Werte der als Inhibitoren verwendeten isolierten Membranlipide lagen zwischen 0,25 und 2,5 M. Zwar wurden andere Lysine verwendet als in der vorliegenden Arbeit, trotzdem bleibt festzuhalten, daß HR AH_{50}-Konzentrationen aufwies, die um mehrere Zehnerpotenzen niedriger lagen.

Ein Vergleich dieser und anderer Arbeiten (19, 23, 28) mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit erlaubt die Aussage, daß HR einer der am stärksten wirksamen Hämolyse-Inhibitoren ist.

2. Versuch einer Charakterisierung der Hämolysine anhand der Hämolyseinhibition durch HR

Inhibitoren werden häufig verwendet, um Hämolysine zu charakterisieren (5, 19, 23, 28).

Die Versuche im isotonischen Milieu erbrachten für alle verwendeten Hämolysine qualitativ das gleiche Ergebnis: Die Konzentrations-Wirkungs-Kurven wurden durch HR in der halblogarithmischen Darstellung parallelverschoben. Nur die hierfür nötigen HR-Konzentrationen waren verschieden. Unterschiede in der HR-Wirkung auf verschiedene Hämolysine ergaben sich jedoch in der Wirkung auf den biphasischen Effekt der unspezifischen Hämolysine.

Es sollte geprüft werden, ob HR auch die Stabilisierungsphase hemmt. Dies war bei allen untersuchten Hämo-

lysinen der Fall, mit einer Ausnahme: DOC. Die Stabilisierung der Erythrozyten gegen osmotische Hämolyse war hier nicht gehemmt, im höheren Konzentrationsbereich sogar eher verstärkt. Dies ist ein Hinweis auf einen anderen Wirkmechanismus bei der DOC-Hämolyse gegenüber den anderen unspezifischen Hämolysinen. Aber auch bei diesen war ein Unterschied festzustellen: Während die Hämolyse durch CPZ, Promethazin und Polidocanol im isotonischen Milieu durch HR etwa gleich stark gehemmt wurde (s. AH_{50}-Werte), zeigte sich am biphasischen Effekt im hypotonischen Milieu eine um einen Faktor 7 bis 8 stärkere Parallelverschiebung bei den Phenothiazinen gegenüber Polidocanol, bei gleicher HR-Konzentration. Die Tenside SDS und CTAB wurden genauso wie Polidocanol gehemmt.

Offensichtlich kann man - neben der altbekannten Einteilung in spezifische und unspezifische Hämolysine - die unspezifische nach ihrem Verhalten gegenüber dem Inhibitor HR noch weiter unterteilen. Die in dieser Arbeit verwendeten Hämolysine könnten folgenden Gruppen zugeordnet werden:

1. Unspezifische Hämolysine, charakterisiert durch den biphasischen Effekt
   a) Aliphatische Tenside: Polidocanol, SDS, CTAB
      geringe Parallelverschiebung beider Phasen
   b) Phenothiazine: CPZ, Promethazin
      starke Parallelverschiebung beider Phasen
   c) DOC:
      fehlende Parallelverschiebung der Stabilisierungsphase
2. Spezifische Hämolysine, charakterisiert durch das Fehlen der Stabilisierungsphase
   Aescin, Digitonin

3. Zur Frage des Wirkmechanismus der Hämolyseinhibition durch HR

Die Grundfrage war: Wirkt HR am Erythrozyten oder reagiert es mit dem Hämolysin in der Lösung ("chemischer Antagonismus")? Ein direkter Zugang zu diesem Problem wird von PONDER (23) angegeben: Variation der Reihenfolge, in der Erythrozyten, Hämolysin und Inhibitor in die Reaktionslösung gegeben werden, ggf. mit Vorinkubation zweier Komponenten vor Zugabe der dritten. Diese Methode wurde auch in späteren Arbeiten angewandt (5, 37). Sie ist unter B.2.3 beschrieben.

Das Prinzip besteht darin, den Inhibitor einmal mit dem Lysin und einmal mit den Erythrozyten in Kontakt zu bringen, bevor die Hämolyse gestartet wird.

Im Falle eines chemischen Antagonismus müßte die Hämolysehemmung stärker ausgeprägt sein, wenn der Inhibitor zuerst mit dem Lysin in Kontakt war.

Im Falle einer Schutzwirkung am Erythrozyten müßte die Hämolysehemmung stärker ausgeprägt sein, wenn der Inhibitor zuerst mit den Erythrozyten in Kontakt war.

Nach rechnerischer Elimination von Störfaktoren (Anlagerung der Hämolysine an die Plastikwand der Reaktionsgefäße, s.a. Abb. 13 und 14) zeigte sich kein Unterschied in der inhibitorischen Wirkung des HR nach Vorinkubation HR + Lysin bzw. HR + Erythrozyten.

Eine Entscheidung zwischen Erythrozyten oder Hämolysinmolekülen als Reaktionspartner von HR konnte also mit dieser Methode nicht getroffen werden. Auch PONDER (23) mußte einräumen, daß die Entscheidung tatsächlich in vielen Fällen nicht möglich ist.

Es besteht eine weitere Möglichkeit, die Frage nach dem Reaktionspartner des HR anzugehen: Abb. 12 stellt das Ergebnis eines Versuches dar, in dem HR vor dem Start der Hämolyse unterschiedlich lange mit dem Lysin Aescin vorinkubiert wurde. Die Überlegung war: Im Falle eines chemischen Antagonismus müßte die Hämolyse um so stärker gehemmt sein, je länger HR und Aescin vorher Zeit hatten, miteinander zu reagieren. Mit zunehmender Vorinkubationszeit müßte also die Hämolyse geringer werden. Das war nicht der Fall.

Wirkmechanismus und Reaktionspartner des HR bei der Hämolyseinhibition konnten also mit den von PONDER angegebenen Methoden nicht geklärt werden. Im folgenden werden die weiteren Ergebnisse der vorliegenden Arbeit diskutiert und gewertet, um auf diesem Wege doch noch zu einer Modellvorstellung über die Wirkungsweise des HR bei der Hämolyseinhibition zu gelangen.

Zuerst sollen die Wirkungen besprochen werden, die HR selbst auf Erythrozyten ausübt, also ohne die Anwesenheit eines Hämolysins.

HR besteht aus Molekülen mit hydrophilen und hydrophoben Determinanten. Es ist oberflächenaktiv und bildet ab einer Konzentration von 10^{-3} M Micellen. Diese Eigenschaften hat es mit den Hämolysinen gemeinsam. Dennoch bewirkte HR selbst keine Hämolyse, weder in isotonischem Puffer noch im hypotonischen Milieu, in dem bereits 50 % der Erythrozyten osmotisch hämolysiert waren. Abb. 6 zeigt zwei Kurvenverläufe für diesen Fall: Wurde die Osmolarität rein rechnerisch konstant gehalten, so nahm die Hämolyse ab einer HR-Konzentration von etwa 10^{-3} M zu und erreichte bei 10^{-1} M fast 100 % (Abb. 6, durchgezogene Linie). Dies ist einfach zu erklären mit der Micellenbildung des HR ab 10^{-3} M: Durch die Zu-

sammenlagerung osmotisch wirksamer Teilchen nimmt die Gesamtosmolarität in der Lösung ab, da bei der Zubereitung der entsprechenden Stammlösungen Elektrolyte durch HR ersetzt wurden, um eine rechnerisch isotonische Lösung zu erhalten. Bei einer hypotonischen Lösung, die ohnehin schon 50 % Hämolyse hervorruft, genügt bereits eine geringe weitere Senkung der Osmolarität für eine erhebliche Zunahme der Hämolyse.

Gibt man dagegen dem auf 50 % Hämolyse eingestellten hypotonischen Puffer einfach ohne Rücksicht auf die Gesamtosmolarität HR zu, so wird die osmotische Hämolyse - ebenfalls ab etwa 10^{-3} M HR - entspechend vermindert (Abb. 6, gestrichelte Linie). Ab dieser Konzentration wird die osmotische Wirkung der zugegebenen HR-Moleküle (und -Micellen) signifikant. (Die Osmolarität beträgt z.B. bei 10^{-2} M HR nicht mehr 138 mOsm, sondern 148 mOsm, abzüglich der o.g. Osmolaritätsminderung durch Micellenbildung.)

Der Verlauf der Kurven in Abb. 6 kann also durch rein physikochemische Vorgänge in der Lösung erklärt werden. Eine darüber hinausgehende Wirkung von HR auf die Erythrozyten liegt offenbar nicht vor. Darum kann die Schlußfolgerung gezogen werden: HR wirkt selbst nicht hämolytisch und hat keinen Einfluß auf die osmotische Hämolyse, weder im Sinne einer Steigerung noch im Sinne einer Hemmung.

Auf einem anderen Gebiet jedoch zeigt HR eine deutliche Wirkung auf Erythrozyten: Es verändert deren Gestalt.

Oberflächenaktive Substanzen in sublytischen Konzentrationen rufen an Erythrozyten zwei Arten von Gestaltveränderungen hervor: Crenation und Invagination. Diese Gestaltveränderungen gehen auch stets der Hämolyse voraus (9, 23, 40). In Abb. 21 sind sie dargestellt:

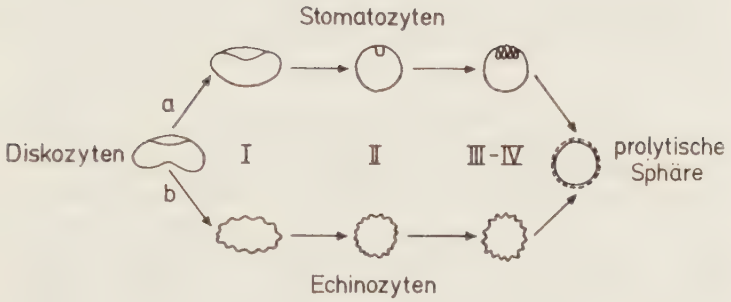


Abb. 21: Gestaltveränderungen von Erythrozyten unter dem Einfluß oberflächenaktiver Substanzen (mod. nach 9, 23, 40)
a) Invagination (Internalisation)
b) Crenation (Externalisation)
I, II, III, IV: Stadien nach FUJII et al. (9) bei steigender Konzentration der Substanzen

Invagination = Internalisation (Abb. 21 a) führt zur Bildung von cup-Formen, auch Stomatozyten genannt, zunächst ohne Volumenzunahme des Erythrozyten: Stadium I (9). Bei längerem Einwirken oder bei höheren Konzentrationen des Lysins bläht sich der Erythrozyt auf (Stadien II bis IV) und erreicht schließlich das irreversible Stadium der prolytischen Sphäre, dem bald die Hämolyse folgt (23).

Crenation = Externalisation (Abb. 21 b) führt zur Bildung von Stechapfelformen, auch Echinozyten genannt, ebenfalls zunächst ohne (Stadium I), dann mit Volumenzunahme des Erythrozyten, wieder bis zur prolytischen Sphäre mit konsekutiver Hämolyse.

Wie SHEETZ und SINGER (40) und FUJII et al. (9) zeigen konnten, sind die membrangängigen kationischen amphiphilen Stoffe Invaginatoren und die anionischen sowie alle nicht membrangängigen amphiphilen Stoffe Crenatoren.

Dies wird mit der "bilayer couple hypothesis" (40) erklärt: Amphiphile Stoffe lagern sich je nach Ladung und Membrangängigkeit vorwiegend in die innere oder äußere Hälfte der Membran ein. Die betreffende Membranseite wird dadurch ausgedehnt, und dies führt an der Außenseite zu einer Ausstülpung (Crenation) und an der Innenseite zu einer Einstülpung (Invagination) der Membran.

Die beschriebenen Gestaltveränderungen resultieren demnach aus einer Interaktion der amphiphilen Stoffe mit der Erythrozytenmembran. Dabei ist nicht sicher, ob es sich wirklich immer um eine Einlagerung in die Lipidschicht handelt, oder ob auch die Proteine und Kohlehydrate der Erythrozytenmembran an der Gestaltveränderung beteiligt sind (9, 40).

HR erwies sich nun als ein Crenator (C. 9, Abb. 20). Es führte jedoch nur zur Bildung von Echinozyten Grad I. Das ist gut mit der Beobachtung vereinbar, daß HR nicht hämolytisch wirkt, denn die weiteren Grade der Gestaltveränderungen gehen ja mit Volumenzunahme infolge der gestörten Membranpermeabilität einher und führen schließlich zur Hämolyse (23).

Daraus läßt sich der Schluß ziehen, daß HR mit der Außenseite der Erythrozytenmembran in Interaktion tritt, daß es aber dabei nicht zu Permeabilitätsstörungen kommt, wie es bei einem Hämolysin der Fall wäre.

Zur Frage der Bindung von HR durch Erythrozyten.

Nach Inkubation von Erythrozyten mit ^{14}C-markiertem HR bei 37°C und anschließendem dreimaligem Auswaschen mit PBS verblieb im Erythrozytensediment eine Restaktivität. Die Trennung von Zytoplasma und Membranen zeigte, daß diese Aktivität ausschließlich im Zytoplasma lokalisiert war (s. C. 8.2). Es handelte sich also um eine A u f n a h m e i n den Erythrozyten.

Diese Aufnahme zeigte einen charakteristischen zeitlichen Verlauf: Eine schnelle Phase, die in 10 - 30 Minuten abgeschlossen war, und eine langsame, annähernd lineare, die auch nach 4 Stunden noch anhielt (s. Abb. 17 und 18). Insgesamt wurde aber nur wenig HR aufgenommen: Nach mehreren Stunden war erst 1 % der jeweils eingesetzten Gesamtaktivität gebunden.

Aus diesen Ergebnissen läßt sich folgendes ableiten: Wenn HR mit Erythrozyten in Kontakt kommt, diffundieren bestimmte Komponenten mit unterschiedlichen Zeitkonstanten in das Zytoplasma. Die gestrichelten Kurven in Abb. 18 zeigen, wie sich dadurch die beobachtete Aufnahmekinetik erklären ließe - in diesem Beispiel durch Addition der beiden hypothetischen Aufnahmekurven. Aus der geringen Menge kann man schließen, daß es sich dabei um nicht umgesetztes Rutin und Aglycone (27) handelt, Substanzen, die sehr hydrophob sind und deshalb gut membrangängig sein dürften. Die Hauptkomponenten Mono-, Di-, Tri- und Tetra-HR, deren Konzentrationen weit über 1 % liegen (s. "Material"), können die Erythrozytenmembran nur sehr schwer passieren.

Die Frage, ob diese Aufnahme von HR-Komponenten in die Erythrozyten ursächlich mit der Hämolyseinhibition durch HR zusammenhängt, konnte eindeutig verneint werden:

1. Wurden Erythrozyten wie in den "Bindungsstudien" mit HR inkubiert und dann der Überstand für Hämolyseversuche verwendet, so zeigte sich, daß dieser Überstand noch die gleiche antihämolytische Eigenschaft besaß wie eine gleich konzentrierte HR-Vergleichslösung (s. C. 8.3).

2. Mit HR vorinkubierte Erythrozyten zeigten bereits nach einmaligem Auswaschen keine erhöhte Resistenz mehr gegen Hämolyse (C. 7.).

Nun zu der Frage, ob eine Anlagerung des HR an die Erythrozytenoberfläche, wie sie durch die Gestaltveränderungen der Erythrozyten bei Kontakt mit HR wahrscheinlich gemacht wurde (s.o.), Ursache der inhibitorischen Wirkung des HR auf die Hämolyse durch oberflächenaktive Substanzen sein könnte.

Es gibt zwei Möglichkeiten, wie durch eine Anlagerung von HR an die Oberfläche des Erythrozyten dieser vor Hämolyse geschützt werden könnte.

E r s t e n s könnte eine über der eigentlichen Membran gelegene "Permeabilitätsbarriere" verstärkt werden. BONSALL und HUNT (4) postulieren eine solche Permeabilitätsbarriere - z.B. die Kohlehydrat-Seitenketten der Membran-Glycoproteine -, die vor allem großen, sperrigen Molekülen den Zutritt zur Membran erschwert, und erklären damit die längere lag-Phase der Hämolyse durch Triton-X-100 (große, sperrige Moleküle) gegenüber der SDS-Hämolyse (relativ kleine, schlanke Moleküle). Eine Verstärkung dieser Permeabilitätsbarriere durch Anlagerung von HR könnte demnach auch die relativ schwache Wirkung von HR gegen SDS und CTAB erklären (Abb. 8). Beide bestehen aus schlanken, "nadelförmigen" Molekülen.

Z w e i t e n s könnte HR bei der Anlagerung an die Erythrozytenoberfläche die gleichen Strukturen (formal als "Hämolyse-Rezeptoren" zu bezeichnen) besetzen wie die Hämolysine. Es könnte mit diesen im Sinne einer kompetitiven Hemmung um jene Bindungsorte konkurrieren. Mit dieser Vorstellung steht die Beobachtung in Einklang, daß die Hämolysehemmung durch HR tatsächlich die formalen Kriterien einer kompetitiven Verdrängung erfüllt (Parallelverschiebung der Dosis-Wirkungs-Kurven in halblogarithmischer Darstellung - Abb. 5, Aufhebbarkeit der Hemmung durch Erhöhen der Lysin-Konzentration - Abb. 11).

Eine Entscheidung zwischen diesen beiden Möglichkeiten kann durch die Untersuchungen zum Zeitverlauf der Hämolyse (C. 5.) getroffen werden.

Verstärkung der Permeabilitätsbarriere würde bedeuten: Wenn angelagertes HR den Hämolysin-Molekülen den Zugang zur Membran erschwert, müßte die Hämolyse in erster Linie verzögert sein, d.h. die lag-Phase länger und der Ablauf langsamer. Irgendwann sollte das Verteilungsgleichgewicht der Hämolysin-Moleküle zwischen Lösungsphase und Membran schließlich doch erreicht werden, so daß der endgültige Hämolysegrad der gleiche wäre wie bei der ungehemmten Hämolyse. Abb. 22 zeigt dieses erwartete Verhalten und stellt es am Beispiel der SDS-Hämolyse dem tatsächlichen gegenüber: Sowohl die lag-Phase als auch die Geschwindigkeit der Hämolyse wurden durch HR nicht beeinflußt.

Die Möglichkeit einer Verstärkung der "Permeabilitätsbarriere" durch angelagertes HR war also auszuschließen, die einer kompetitiven Verdrängung bleibt noch offen.

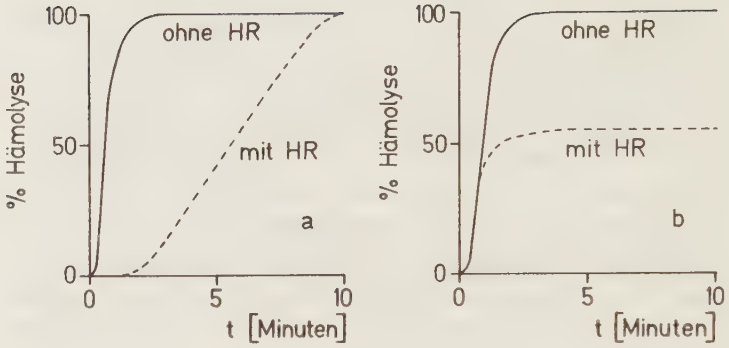


Abb. 22 a und b:
Zeitlicher Verlauf der SDS-Hämolyse mit und ohne HR
a) bei "Verstärkung der Permeabilitätsbarriere" zu erwartender Kurvenverlauf nach Hemmung der SDS-Hämolyse durch HR: Verlängerte lag-Phase und verminderte Steigung
b) tatsächlicher Kurvenverlauf (s. C. 5.)

Zuletzt noch zur Möglichkeit einer direkten Wechselwirkung zwischen HR und Lysin:

Ein wichtiger Punkt ist die bereits erwähnte große chemische Verschiedenheit der Substanzen, deren Wirkung durch HR gehemmt wurde (s.a. B. 1. und Abb. 2). Die einzige gemeinsame Eigenschaft scheint ihr amphiphiler Charakter zu sein.

Für einen chemischen Antagonismus dürfte also nur eine hydrophobe Wechselwirkung, etwa im Sinne einer Bildung gemischter Micellen, in Frage kommen.

Alle verwendeten Hämolysine sind oberflächenaktiv und bilden ab einer bestimmten Konzentration (CMC) Micellen. Tabelle III stellt die CMC-Werte von fünf Lysinen ihrer H_{50}-Konzentration gegenüber. In allen Fällen

liegt die CMC wesentlich höher als die für die Erzeugung von Hämolyse erforderliche Konzentration (ausgedrückt als H_{50}).

Tabelle III: Vergleich von H_{50} und CMC für 5 Hämolysine

Hämolysin	H_{50} in M	CMC in M	
Aescin	2×10^{-6}	1×10^{-5}	(21)
CTAB	$1{,}5 \times 10^{-5}$	$2{,}8 \times 10^{-4}$	(45)
SDS	1×10^{-4}	$3{,}4 \times 10^{-3}$	(45)
CPZ	$2{,}7 \times 10^{-4}$	$5{,}4 \times 10^{-3}$	(42)
DOC	6×10^{-4}	$2{,}4 \times 10^{-3}$	(1)

Die H_{50}-Werte wurden aus Tabelle I entnommen, die CMC aus den in Klammern zitierten Literaturstellen. (Für die restlichen vier Hämolysine konnte in der Literatur keine CMC gefunden werden.)

Auch HR ist oberflächenaktiv und somit ebenfalls in der Lage, durch Selbstaggregation Micellen oder ähnliche Komplexe zu bilden. Seine CMC liegt bei 10^{-3} M (21).

Es ist daher wahrscheinlich, daß HR und Hämolysine miteinander auch gemischte Micellen bilden können. Tatsächlich konnte vor kurzem für CPZ und DOC eine Bildung von höhermolekularen Aggregaten mit HR nachgewiesen werden (44).

Zusammenfassend kann also davon ausgegangen werden, daß HR an mindestens drei Vorgängen in der Reaktionslösung teilnimmt, die prinzipiell als Ursache seiner inhibitorischen Wirkung auf die Lysin-induzierte Hämolyse in Frage kommen:

1. Aufnahme einiger Komponenten in den Erythrozyten
2. Interaktion mit der Erythrozytenoberfläche
3. Bildung gemischter Micellen mit den Lysinen

Punkt 1 konnte als Ursache der Hämolyseinhibition ausgeschlossen werden (s.o.). Bleiben Punkt 2 und 3. Sie entsprechen den beiden eingangs beschriebenen grundsätzlichen Möglichkeiten (Interaktion des HR mit dem Erythrozyten oder mit dem Lysin), nur daß die Zahl der Möglichkeiten, wie eine solche Interaktion jeweils aussehen könnte, nun auf je eine eingeschränkt ist:

- Für eine Interaktion HR-Erythrozyt als Ursache der Hämolyseinhibition ist eine kompetitive Verdrängung des Lysins vom hypothetischen "Hämolyserezeptor" wahrscheinlich.

- Für eine Interaktion HR-Lysin als Ursache der Hämolyseinhibition scheint die Bildung gemischter Micellen die einzige Möglichkeit zu sein.

Durch die in C.6. beschriebenen Experimente (Vorinkubation) konnte zwischen diesen beiden Möglichkeiten nicht entschieden werden: Die Reihenfolge, in der Erythrozyten, Lysin und HR in Kontakt kamen, hatte offenbar keinen Einfluß auf die Hämolysehemmung durch HR. Der Versuch, diese Beobachtung zu erklären, führte zu folgender Annahme: Es sind eben beide Vorstellungen richtig; die Ursache der Hämolysehemmung durch HR liegt sowohl in einer kompetitiven Verdrängung als auch in der Mischmicellenbildung.

Ich möchte nun ein Modell entwickeln, das auf dieser Voraussetzung beruht.

Der Grundgedanke dabei ist, daß beide HR-Wirkungen, sowohl die kompetitive Verdrängung am "Hämolyserezeptor" als auch der chemische Antagonismus auf ein und derselben Eigenschaft des HR beruhen: seiner Amphiphilie bzw. Oberflächenaktivität.

Im Falle des chemischen Antagonismus konnte eine hydrophobe Wechselwirkung bereits wahrscheinlich gemacht werden (Mischmicellenbildung, s.o.). Eine Bildung von höhermolekularen Aggregaten aus HR und CPZ bzw. DOC konnte, wie oben erwähnt, inzwischen auch nachgewiesen werden (44).

Nun zur kompetitiven Verdrängung: Nach der allgemein anerkannten Stufeneinteilung nach REMAN et al. (24), s. Einleitung, geht dem eigentlichen Hämolyseprozeß, der mit der Penetration in die Membran beginnt, eine Absorption des Lysins an die Erythrozytenoberfläche voraus. Diese erfolgt sicher nicht gleichmäßig, sondern bevorzugt an bestimmten Oberflächenstrukturen, die man formal als "Hämolyserezeptoren" bezeichnen kann. Die Interaktion Hämolysin - Hämolyserezeptor muß in hohem Grade unspezifisch sein, da es eine sehr große Zahl von Hämolysinen z.T. stark unterschiedlicher Struktur gibt (s.a. Abb. 2). Auch wenn man annimmt, daß die Erythrozytenoberfläche mehrere Strukturen besitzt, die als Hämolyserezeptoren in Frage kommen, müssen immer noch sehr viele verschiedene Lysine an ein und dieselbe Struktur absorbiert werden. Es liegt nahe, als Grundlage für die Interaktion Hämolysin-Hämolyserezeptor eine hydrophobe Wechselwirkung anzunehmen. Da, wie schon mehrfach erwähnt wurde, auch HR zu hydrophoben Wechselwirkungen fähig ist, müßte HR sich genauso wie die Lysine an die Hämolyserezeptoren anlagern. Der gleiche Vorgang, nämlich hydrophobe Wechselwirkung, der auch zur Bildung gemischter Micellen aus HR und Lysin führt, könnte also auch für eine kompetitive Verdrängung am "Hämolyserezeptor" verantwortlich sein.

Modell für den Wirkmechanismus der Hämolyseinhibition durch HR

HR ist ein amphiphiler, oberflächenaktiver Stoff, wie die Hämolysine auch. Es bewirkt jedoch im Gegensatz zu diesen keine Hämolyse. Seine hemmende Wirkung auf die Lysin-induzierte Hämolyse erklärt sich folgendermaßen:

1. HR-Moleküle und Lysinmoleküle bilden durch hydrophobe Aggregation Komplexe im Sinne von gemischten Micellen. Diese unterliegen einem dynamischen Gleichgewicht nach dem Massenwirkungsgesetz: Ständig verlassen HR- und Lysinmonomere den Komplex, und ständig treten neue HR- und Lysinmonomere in den Komplex ein. Durch die Einlagerung in die Komplexe ist die Lysinkonzentration in der freien Lösung vermindert. Dies ist eine Teilursache der Hämolysehemmung.

2. Sowohl HR-Moleküle (und -Aggregate) als auch Lysinmoleküle können sich an bestimmte Strukturen der Erythrozytenoberfläche - formal als "Hämolyserezeptoren" bezeichnet - anlagern, und zwar ebenfalls durch hydrophobe Wechselwirkung. Dabei verdrängen sie sich kompetitiv von jenen Bindungsorten, und es stellt sich auch für diesen Vorgang ein dynamisches Gleichgewicht ein. Dadurch ist für die Lysinmoleküle der Zugang zu den Bindungsstellen behindert. Dies ist die zweite Teilursache der Hämolysehemmung.

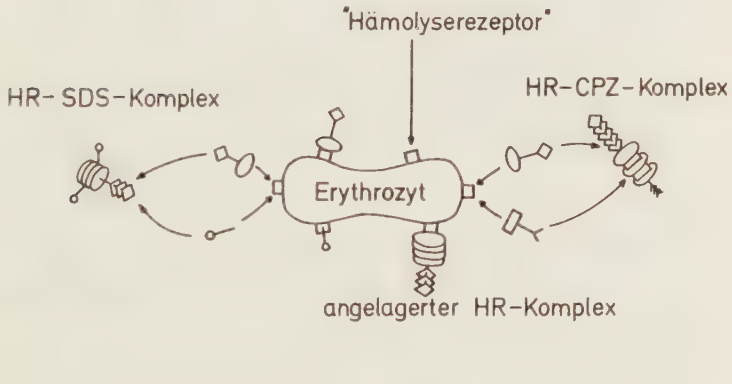
3. Beide Reaktionen (1 und 2) laufen sehr schnell ab, in jedem Falle ist das dynamische Gleichgewicht vor Ablauf von 2 Minuten eingestellt.

4. Hämolyse in Gegenwart von HR ist bei gegebener Hämolysin-Konzentration also letzten Endes eine Funktion

a) der HR-Konzentration und somit
   - der Aufnahmekapazität (Zahl und Größe) der entstehenden Mischmicellen für Lysinmonomere,
   - des Zahlenverhältnisses HR-Moleküle (und -Komplexe) zu Lysinmonomeren bei der Konkurrenz um die "Hämolyserezeptoren",

b) der Affinität der Lysinmoleküle
   - zu den HR-Lysin-Komplexen einerseits und
   - zu den "Hämolyserezeptoren" am Erythrozyten andererseits.

Abb. 23 veranschaulicht das Modell.



Zeichenerklärung :

HR-Molekül

CPZ-Molekül

SDS-Molekül

Es soll nun gezeigt werden, daß dieses Modell die in der vorliegenden Arbeit gewonnenen Ergebnisse erklären kann.

1. Unterschiede in der Hemmwirkung des HR gegenüber der durch verschiedene Lysine hervorgerufenen Hämolyse (Abb. 4), ausgedrückt als AH_{50} (Tab. I). Sie ließen sich durch die Affinitätsverhältnisse erklären: Die schwächer gehemmten Hämolysine sollten die größere Affinität zu den Hämolyserezeptoren und/oder die geeignete Affinität zu den HR-Lysin-Komplexen haben.

   Am schwächsten war die Hemmwirkung des HR bei CTAB und SDS ausgeprägt. Diese beiden Hämolysine sind zugleich diejenigen, die im zeitlich Verlauf bei jeder hämolytisch wirkenden Konzentration die kürzesten lag-Phasen aufwiesen (Abb. 8). Es ist möglich, dies als Ausdruck einer besonders hohen Affinität zur Erythrozytenmembran (bzw. zu den "Hämolyserezeptoren") zu interpretieren. Andererseits liegt es nahe, daß flächige Moleküle mit hydrophobem Kern eine höhere Affinität zu HR haben, das ähnlich aufgebaut ist, als die stabförmigen Moleküle der Tenside SDS und CTAB. Beide Überlegungen stehen in Einklang mit dem Modell.

2. Es ist anhand dieses Modells sogar möglich, den Unterschied zwischen den beiden Maßstäben für die HR-Wirkung, AH_{50} und Verschiebungsfaktor (Tab. I) zu erklären: Die AH_{50}-Werte repräsentieren relativ niedrige HR-Konzentrationen ($2{,}6 \times 10^{-4}$ M bis 2×10^{-2} M). Die Bestimmung der Verschiebungsfaktoren geschah dagegen stets bei 2×10^{-2} M HR. Dieser Wert liegt weit über der CMC von HR (10^{-3} M), d.h., HR lag in dieser Konzentration schon von vorn-

herein als Micellensuspension vor. Es liegt daher nahe anzunehmen, daß in diesen Versuchen die Bildung gemischter Micellen der überwiegende Mechanismus der Hämolysehemmung war - die Lysinmoleküle brauchten sich ja nur noch in die bereits vorhandenen HR-Komplexe einzulagern. Es wäre also zu fordern, daß Molekülen mit hoher Affinität zu den HR-Komplexen besonders hohe Verschiebungsfaktoren zuzuordnen sind. Die AH_{50} von CPZ und Promethazin liegt in der gleichen Größenordnung wie die von Aescin, Digitonin, Polidocanol und Thiazinamium. Ihre Verschiebungsfaktoren sind dagegen um ein Mehrfaches höher als die der übrigen Lysine. CPZ und Promethazin sollten also eine besonders hohe Affinität zu den HR-Komplexen besitzen. Es fällt auf, daß diese beiden Moleküle unter allen verwendeten Hämolysinen dem HR-Molekül am ähnlichsten sind: Sie besitzen wie dieses zwei aromatische Ringe und sind im Gegensatz zum Analogon des Promethazin, dem Thiazinamium, elektrisch neutral. Dies ist ein Hinweis darauf, daß sie auch eine hohe Affinität zu HR haben könnten.

3. Anhand dieser Überlegungen kann die Anordnung der Lysine in Tabelle I revidiert werden:

   Es wurde gefordert, daß bei HR-Konzentrationen über 10^{-3} M (CMC) die Bildung gemischter Micellen der überwiegende Mechanismus der Hämolysehemmung sei, weil hier bereits vorgebildete HR-Komplexe vorlägen. Unterhalb 10^{-3} M liegen die HR-Moleküle als Monomere vor. Die AH_{50}-Bestimmungen oberhalb und unterhalb von 10^{-3} M HR sind also nicht voll vergleibar. Eliminiert man nun die AH_{50}-Werte über 10^{-3} M (die Werte für die drei "Ausreißer" in Abb. 4: DOC, SDS und CTAB) aus der Tabelle I und stellt sie

gesondert darunter, so ergeben sich folgende Zusammenstellungen (Tabelle IV, Legende s. Tabelle I):

Tabelle IV:

Hämolysin	H_{50} (M)	AH_{50} (M)	Zahlenverhältnis
Digitonin	2×10^{-6}	7×10^{-4}	1 : 350
Aescin	2×10^{-6}	3×10^{-4}	1 : 150
Polidocanol	9×10^{-5}	9×10^{-4}	1 : 10
CPZ	$2{,}7 \times 10^{-4}$	$7{,}5 \times 10^{-4}$	1 : 3
Promethazin	1×10^{-3}	$2{,}6 \times 10^{-4}$	4 : 1
Thiazinamium	1×10^{-2}	6×10^{-4}	17 : 1
CTAB	$1{,}5 \times 10^{-5}$	2×10^{-2}	1 : 1.333
SDS	1×10^{-4}	7×10^{-3}	1 : 70
DOC	6×10^{-4}	$3{,}5 \times 10^{-3}$	1 : 6

Die frühere Feststellung, die AH_{50}-Werte und die Zahlenverhältnisse der Moleküle ließen sich in keinen Zusammenhang mit der H_{50} der Lysine bringen, entfällt nun: Nimmt man die drei Lysine mit AH_{50}-Werten über der CMC von HR heraus, ergibt sich eine klare Abhängigkeit der Molekülzahlenverhältnisse bei der AH_{50} von der hämolytischen Potenz der Lysine: Je wirksamer ein Lysin ist, desto mehr HR-Moleküle werden benötigt, um die Wirkung eines Lysinmoleküls zu neutralisieren. Die AH_{50}-Werte der so bereinigten Tabelle sind nun größenordnungsmäßig gleich; sie schwanken nur noch in einem Bereich von $2{,}6 \times 10^{-4}$ bis 9×10^{-4} M HR. Dies ist ein indirekter Hinweis darauf, daß an der HR-Wirkung eine Interaktion mit dem Erythrozyten (bzw. mit seinen "Hämolyserezeptoren") zumindest beteiligt sein muß,

denn es wird ja eine W i r k u n g antagonisiert und nicht eine S t o f f m e n g e . Im letzteren Fall wäre eher zu erwarten, daß die AH_{50}-Werte eine gewisse Abhängigkeit von der H_{50} zeigen, die immerhin um einen Faktor 5.000 variiert (2×10^{-6} bis 1×10^{-2} M); die AH_{50} sollte also bei schwach wirkenden Hämoly-sinen (hohe H_{50}) größer sein als bei stark wirkenden (niedrige H_{50}). Dies ist eindeutig nicht der Fall.

4. Das Fehlen jeglicher Wirkung des HR auf die osmotische Hämolyse steht gut in Einklang mit dem Modell: Da osmotische Hämolyse nicht über Lysine vermittelt wird, sondern ein rein physikalischer Vorgang ist, kann sie weder durch Micellenbildung noch durch Besetzung von Rezeptoren beeinflußt werden.

5. Auch die Wirkung von HR auf den biphasischen Effekt der unspezifischen Hämolysine im hypotonischen Milieu läßt sich mit dem vorgestellten Modell vereinbaren: Sowohl die Stabilisierungsphase als auch die Destabilisierung beruhen auf einer hydrophoben Wechselwirkung des Lysins mit der Erythrozytenmembran. Es müssen also auch beide Wirkungen durch HR gehemmt werden; die gesamte biphasische Kurve wird im Konzentrations-Wirkungs-Diagramm nach rechts verschoben. Das war - mit einer Ausnahme, DOC - auch bei allen untersuchten unspezifischen Lysinen der Fall (s. Abb. 7).

   Die fehlende Parallelverschiebung der Stabilisierungsphase bei DOC wird jedoch durch das Modell nicht erklärt.

6. Zeitlicher Verlauf der Hämolyse: HR veränderte den Zeitverlauf in jedem Falle genauso wie eine ent-

sprechende Verminderung der Lysinkonzentration (Abb. 10). Diese Beobachtung steht in Übereinstimmung mit beiden Teilmechanismen des Modells: Sowohl die kompetitive Verdrängung als auch die Mischmicellenbildung führen zu einer zahlenmäßigen Verminderung der effektiv am Hämolyserezeptor wirksamen Lysinmoleküle. Das muß den gleichen Effekt haben wie eine Herabsetzung der Lysinkonzentration.

Auch das Ergebnis des Versuches mit nachträglicher Erhöhung der Lysinkonzentration (Abb. 11) läßt sich gleichermaßen aus beiden Teilmechanismen erklären: Für kompetitive Verdrängung ist die Aufhebbarkeit der Inhibitorwirkung durch Erhöhung der Konzentration des Agonisten ohnehin ein klassisches Kriterium, und bei der Mischmicellenbildung ist der gleiche Effekt zu erwarten, da sie ebenfalls einem dynamischen Gleichgewicht unterliegt (s.o.): Nach Erhöhung der Lysinkonzentration muß bei konstantem Verteilungsgleichgewicht sowohl die Menge der gebundenen als auch die Menge der freien Lysinmoleküle zunehmen und mit letzteren auch die Hämolyse.

7. Vorinkubation: Der negative Ausfall der Experimente mit Vorinkubation der Reaktionspartner wurde bereits ausführlich diskutiert. Das Modell erklärt diesen Befund folgendermaßen: In a l l e n Versuchen der vorliegenden Arbeit (nicht nur in den Vorinkubationsversuchen) war HR zwangsläufig entweder mit den Erythrozyten oder mit dem Lysin zuerst in Kontakt, bevor die Hämolyse mit dem dritten Reaktionspartner gestartet wurde. Das Modell fordert nun, daß beide Mechanismen - Interaktion des HR mit den Erythrozyten u n d mit dem Lysin - an der Wirkung des HR beteiligt sind. Es war also stets bereits eine der beiden Teilwirkungen "vorinkubiert".

Unter der Voraussetzung, daß beide Teilmechanismen etwa in gleichem Maße zur Hämolysehemmung beitragen, muß also die Hämolysehemmung bei beiden "Vorinkubationstypen" gleich stark sein. Der Beobachtung, daß verlängerte Vorinkubationszeiten keine Verstärkung des HR-Effektes erbrachten (s. Abb. 12), wurde im Modell durch die Forderung einer schnellen Gleichgewichtseinstellung bei beiden Teilmechanismen Rechnung getragen.

8. Die Auswaschbarkeit des HR-Effekts steht voll in Einklang mit dem Modell. Daß Mischmicellen ausgewaschen werden, ist selbstverständlich, und auch die "Rezeptorbindung" des HR ist reversibel und unterliegt einem dynamischen Gleichgewicht, das nach Auswaschen sofort praktisch vollständig auf die "ungebundene" Seite verschoben wird.

9. Die Aufnahme bestimmter HR-Bestandteile in die Erythrozyten (s. Ergebnisse Punkt 8) hat, wie gesondert gezeigt werden konnte, keine Bedeutung für die Hämolysehemmung und berührt daher auch die Frage nach der Richtigkeit des Modells nicht.

10. Erythrozytengestalt: Wie jede oberflächenaktive Substanz, die die Erythrozytenmembran nicht durchdringen kann - und das ist bei HR offensichtlich der Fall (s. Ergebnisse Punkt 8 und Diskussion); die von den Erythrozyten aufgenommenen Komponenten sind nur ein sehr kleiner Teil der Gesamtmenge von HR in der Lösung und entsprechen "Verunreinigungen" -, transformiert HR Erythrozyten zu Echinozyten. Ob dieser Befund durch die Anlagerung an "Hämolyserezeptoren" zu erklären ist oder ob es sich um einen gesonderten Effekt handelt, kann nicht entschieden werden. Beide Möglichkeiten stehen jedoch in Einklang mit dem Modell.

11. Kaninchenerythrozyten: Da die dem Modell zugrunde gelegte hydrophobe Wechselwirkung zwischen Erythrozyten, Lysin und HR ein sehr unspezifischer Vorgang ist, ebenso wie die beiden sich daraus ergebenden Teilmechanismen, fordert das Modell, daß bei der antihämolytischen Wirkung des HR in vitro keine entscheidenden Speziesunterschiede auftreten sollten. Bei den untersuchten Kaninchenerythrozyten war diese Forderung tatsächlich erfüllt: HR wirkte in bezug auf die Aescin-Hämolyse, die osmotische Hämolyse und die Auswaschbarkeit auf Kaninchenerythrozyten qualitativ und sogar quantitativ genauso wie auf menschliche Erythrozyten (s. Ergebnisse Punkt 10). Vor kurzem konnte außerdem festgestellt werden, daß sich die antihämolytische Wirkung des HR bei Ratten- und Hundeerythrozyten ebenfalls nicht von der bei menschlichen Erythrozyten unterscheidet (44).

Ich fasse zusammen: Das vorgestellte Modell steht mit allen Beobachtungen in Einklang (Ausnahme: die fehlende Verschiebung der Stabilisierungsphase bei DOC). Unter allen in Betracht gezogenen Modellen erklärt es die Hämolysehemmung durch HR und ihre Randphänomene weitaus am besten.

Das vorgestellte Modell führt die HR-Wirkung auf e i n e n Mechanismus zurück: Hydrophobe Wechselwirkung zwischen HR, Lysin und Strukturen an der Erythrozytenoberfläche. Kompetitive Verdrängung und chemischer Antagonismus sind unter diesem Aspekt durchaus vereinbar. Die recht unübersichtlichen quantitativen Unterschiede in der HR-Wirkung gegenüber den verschiedenen Hämolysinen (s. Tab. I) lassen sich aus den sich aus diesem Modell ergebenden komplizierten hydrophoben Wechselwirkungen zwischen fünf verschiedenen Reaktions-

partnern erklären, von denen jeder mit jedem in Interaktion treten kann: HR / HR-Komplexe / HR-Lysin-Komplexe / Lysin / "Hämolyserezeptoren" an der Oberfläche des Erythrozyten.

4. Möglicher Zusammenhang der Ergebnisse aus der vorliegenden Arbeit mit anderen Wirkungen von HR

In der Einleitung wurden drei Wirkungen des HR vorgestellt:

1. Ödemprotektiver Effekt
2. Schutzwirkung an der glatten Gefäßmuskulatur
3. Schutz des Endothels vor bestimmten Nikotinwirkungen

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden i n v i t r o gewonnen. Unter den drei genannten HR-Wirkungen ist nur die zweite - Schutzwirkung an der glatten Gefäßmuskulatur - ebenfalls Ergebnis einer in-vitro-Untersuchung (Organbad). Isolierte Gefäßstreifen aus der Rattenpfortader wurden u.a. mit Polidocanol geschädigt. Durch vorherige Zugabe von HR zum Organbad konnte diese Schädigung gehemmt werden. In der vorliegenden Arbeit wurden Erythrozyten ebenfalls mit Polidocanol geschädigt, und auch hier konnte durch vorherige Zugabe von HR zur Reaktionslösung diese Schädigung gehemmt werden. Die Experimente sind also vergleichbar. Dabei entspricht die Verminderung der Kontraktilität als Schädigungsmodell allerdings wohl nicht der Hämolyse, sondern eher der Stabilisierung der Erythrozyten im osmotischen Milieu durch sublytische Konzentrationen von Polidocanol (s. Ergebnisse Punkt 4). SEEMAN (33) hat nachgewiesen, daß alle fettlöslichen Anästhetika im hypotonischen Milieu auf Erythrozyten

den beschriebenen biphasischen Effekt ausüben. Die Konzentrationen mit lokal-anästhetischer Wirkung (in vitro) liegen dabei im selben Bereich, in dem (in vitro) diese Substanzen bei Erythrozyten unter osmotischem Stress ihre Stabilisierungsphasen haben. SEEMAN kam zu dem Ergebnis, daß beide Phänomene - Lokalanästhesie und Stabilisierungsphase - eine gemeinsame Ursache haben, nämlich Einlagerung der Moleküle in die Membran mit konsekutiver Expansion der Membran. Nun hat auch Polidocanol lokalanästhetische Eigenschaften (17). Es liegt daher nahe, in der verminderten Kontraktilität der isolierten Gefäßstreifen eine lokalanästhetische Wirkung auf erregbare Membranen (der GMZ) zu sehen. Da sie nach SEEMAN die gleiche Ursache hat wie die Stabilisierungsphase und diese Stabilisierungsphase durch HR zu höheren Konzentrationen verschoben wird (s. Ergebnisse Punkt 4), hat man es offensichtlich mit dem gleichen Effekt zu tun: HR hemmt die Polidocanol-Wirkung und damit sowohl die Stabilisierung von Erythrozyten gegen osmotische Hämolyse als auch die Kontraktilitätsabnahme an isolierten Gefäßstreifen.

Aufgrund dieser Überlegungen sollte es berechtigt sein, für beide Phänomene den gleichen Mechanismus anzunehmen; die Versuchsanordnungen sind ja völlig analog. Das in der vorliegenden Arbeit erstellte Modell der HR-Wirkung kann also auch auf die Schutzwirkung des HR an der glatten Gefäßmuskulatur angewendet werden: Das im Organbad gelöste HR bildet Komplexe mit Polidocanol und konkurriert gleichzeitig mit ihm um Bindungsstellen an der Membran der glatten Muskelzelle. Damit wird die an den Membranbindungsstellen effektiv wirksame Polidocanol-Konzentration herabgesetzt, und die Kontraktilitätsminderung ist schwächer ausgeprägt als ohne HR.

Schwieriger ist ein Vergleich der Ergebnisse aus der vorliegenden Arbeit mit den beiden anderen genannten HR-Wirkungen: Ödemprotektiver Effekt und Schutz des Endothels vor bestimmten Nikotinwirkungen. Sie wurden anhand von in-vivo-Versuchen entdeckt und beschrieben und sind daher nur bedingt mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit vergleichbar.

In der Einleitung wurde die Frage gestellt, ob der von FELIX (6) und HAMMERSEN (11) geforderte unspezifische membranprotektive Effekt des HR auch an einem einfachen Membranmodell, nämlich dem Erythrozyten, nachzuweisen sei (s. "Problemstellung"). Diese Frage kann mit ja beantwortet werden. Es wurde ein protektiver Effekt des HR gegenüber der Hämolyse, also gegenüber einer Schädigung der Erythrozytenmembran durch bestimmte Noxen, festgestellt. Beachtet man die große chemische Vielfalt dieser hämolyseerzeugenden Noxen, so erscheint auch das Attribut "unspezifisch" gerechtfertigt. Bei der Frage, ob der in der vorliegenden Arbeit gefundene Effekt auch auf die protektiv antiödematöse Wirkung von HR im Tierversuch anwendbar sei, stößt man jedoch sofort auf das Problem der Vergleichbarkeit von in-vitro- und in-vivo-Versuchen. Immerhin bleibt festzuhalten, daß sich der in der vorliegenden Arbeit gefundene antihämolytische Effekt gut in die Reihe der übrigen HR-Wirkungen einreihen läßt: Ihr "gemeinsamer Nenner" war: Zellen werden vor Noxen geschützt (s. Einleitung). Diese Aussage gilt auch für den antihämolytischen Effekt: Erythrozyten werden vor der Einwirkung von Hämolysin geschützt. Es ist naheliegend, für alle diese Phänomene ein gemeinsames Grundprinzip anzunehmen. Tatsächlich besteht eine Reihe von Parallelen zwischen ödemprotektivem und antihämolytischem Effekt:

1. HR inhibiert die Wirkung einer Noxe. Einmal rufen die Noxen Hämolyse hervor, im anderen Fall eine Kapillarschädigung.

2. In beiden Fällen ist die Zahl der verschiedenen Noxen groß, in beiden Fällen entstammen sie ganz verschiedenen chemischen Gruppen. In beiden Fällen ist die Wirkung des HR also in hohem Grade unspezifisch.

3. HR hat keine Wirkung auf rein physikalisch bedingte Schädigungen. Es schützt nicht vor osmotischer Hämolyse (Ursache: osmotischer Druck), und es schützt nicht vor hämodynamischen Ödemen (Ursache: hydrostatischer Druck).

4. HR wirkt nur prophylaktisch. Es muß vor Beginn der Schädigung gegeben werden. Nachträgliche Gabe von HR hat in beiden Fällen keine Wirkung.

Punkt 1 und 4 gelten sinngemäß auch für die beiden anderen HR-Wirkungen: Schutzwirkung an der glatten Gefäßmuskulatur und Schutz des Endothels vor bestimmten Nikotinwirkungen.

Bei einem Vergleich von in-vitro- und in-vivo-Untersuchungen weiter zu gehen, als Parallelen aufzuzeigen und auf die Möglichkeit eines gemeinsamen Grundprinzips hinzuweisen, wäre Spekulation. Es bleibt festzuhalten, daß gemeinsame Grundlinien der drei in der Einleitung vorgestellten HR-Wirkungen und der in der vorliegenden Arbeit vorgestellten antihämolytischen Wirkung vorhanden sind und daß ein gemeinsames Grundprinzip als Ursache für alle vier HR-Wirkungen wahrscheinlich erscheint. Das oben entwickelte Modell für die antihämolytische Wirkung kann, wie gezeigt wurde, auch

für die Schutzwirkung an der glatten Gefäßmuskulatur (8) angewandt werden. Inwieweit es auch bei den anderen HR-Effekten anwendbar ist, inwieweit also insbesondere eine hydrophobe Interaktion zwischen HR, Noxe und bestimmten Oberflächenstrukturen der Endothelzelle für das Zustandekommen dieser Effekte verantwortlich gemacht werden kann, müssen weitere Arbeiten zeigen.

E. ZUSAMMENFASSUNG

1. Das wasserlösliche Rutin-Derivat O-(ß-Hydroxyethyl)-rutoside (HR) sollte anhand eines einfachen Membranmodells (Erythrozyt) auf membranstabilisierende Eigenschaften untersucht werden.
2. Dabei zeigte sich, daß menschliche (und andere) Erythrozyten i n v i t r o durch HR vor Hämolyse geschützt wurden. Diese Schutzwirkung erstreckte sich auf Hämolyse durch oberflächenaktive Substanzen ganz unterschiedlicher chemischer Struktur und hämolytischer Potenz. Die osmotische Hämolyse wurde nicht beeinflußt.
3. Der HR-Effekt erwies sich als konzentrationsabhängig, auswaschbar, reversibel und speziesunabhängig.
4. Anhand von radioaktiv markiertem HR wurde nachgewiesen, daß bestimmte HR-Komponenten in den Erythrozyten aufgenommen werden. Wie jedoch gezeigt werden konnte, ist dies nicht die Ursache der Hämolysehemmung.
5. HR veränderte die Erythrozytengestalt: Es führte normale Discozyten in Echinozyten über.
6. Anhand eines Modells wurde versucht, die HR-Wirkungen auf die Hämolyse zu erklären. Hydrophobe Wechselwirkung zwischen HR, Lysin und Strukturen an der Erythrozytenoberfläche könnte alle beobachteten Phänomene erklären: HR bildet einerseits gemischte Micellen mit den Hämolysinen und besetzt andererseits hypothetische "Hämolyserezeptoren" an der Erythrozytenoberfläche.
7. Schließlich wird ein möglicher Zusammenhang der Ergebnisse mit anderen Wirkungen von HR (vor allem Ergebnisse aus Tierversuchen) diskutiert.

F. LITERATURVERZEICHNIS

1. Benzonana, G.
Study of bile salts micelles: Properties of mixed oleate-deoxycholate solutions at pH 9.0.
Biochim. Biophys. Acta 176, 836 - 848 (1969)

2. Biesendorfer, H., D. Wildenauer, W. Felix
Protective effect of O-(ß-hydroxyethyl)-rutosides (HR) against the hemolytic action of various surface-active substances in vitro.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmac. 311 (suppl.), 73 (1980).

3. Biesendorfer, H., W. Felix, D.B. Wildenauer
Studies on the haemolytic action of amphiphilic substances in vitro.
Inhibition by O-(ß-hydroxyethyl)-rutosides.
Biochem.Pharmacol. 30, 2287 - 2292 (1981)

4. Bonsall, R.W., S. Hunt
Characteristics of interactions between surfactants and the human erythrocyte membrane.
Biochim. Biophys. Acta 249, 266 - 280 (1971)

5. Cho, K.S., P. Proulx
Studies on the mechanism of Hemolysis by Acyl Carnitines, Lysolecithins and Acyl Cholines.
Biochim. Biophys. Acta 225, 214 - 223 (1971)

6. Felix, W.
Zur Wirkung von O-(ß-Hydroxyethyl)-rutosiden auf die Ödembildung durch Äthoxysklerol und Thiopental am Hinterlauf der Katze.
In: W. Voelter, G. Jung (Hrsg.), O-(ß-Hydroxyethyl)-rutoside - experimentelle und klinische Ergebnisse.
S. 93 - 102.
Springer Verlag, Berlin - Heidelberg - New York, 1978

7. Felix, W.
Zum Problem "Venenmittel".
Med. Welt 31, 813 - 816 (1980)

8. Felix, W., H.J. Backhaus, P. Eichler, G. Hennings
Protective and curative effect of O-(ß-hydroxyethyl)-rutosides against injury of isolated portal veins caused by Polidocanol and Etacrynic Acid.
Ak. Kiado (Verlag der Ungarischen Akademie der Wissenschaften, Budapest), 1981

9. Fujii, T., T. Sato, A. Tamura, M. Wakatsuki, Y. Kanaho
Shape changes of human Erythrocytes induced by various amphipathic drugs acting on the membrane of the intact cells.
Biochem.Pharmacol. 28, 613 - 620 (1979)

10. Goodman, L.S., A. Gilman
The pharmacological basis of therapeutics,
Fourth ed. 1669 - 1671
Mac Millan Comp. New York, 1970

11. Hammersen, F.
Zur Ultrastruktur experimenteller Ödeme und deren Beeinflussung durch O-(ß-Hydroxyethyl)-rutoside.
In: Voelter-Jung, a.a.O., S. 103 - 120

12. Haydon, D.A., J. Taylor,
The Stability and Properties of Bimolecular Lipid Leaflets in Aqueous Solutions.
J. Theoret. Biol. 4, 281 - 296 (1963)

13. Helenius, A., K. Simons
Solubilization of membranes by detergents.
Biochim. Biophys. Acta 415, 29 - 79 (1975)

14. Hladovec, J.
Endothelial injury by nicotine and its prevention.
Experientia 34, 1585 (1978)

15. Isomaa, B.
Interactions of surface-active alkyltrimethylammonium salts with the erythrocyte membrane
Biochem.Pharmacol. 28, 975 - 980 (1979)

16. Kondo, T., M. Tomizawa
Mechanism of hemolysis by cationic surface-active agents
J. pharm. Sci. 58, 1378 - 1381 (1969)

17. Mitteilung der Fa. Kreussler

18. Lennert, K.
in M. Eder, P. Gedigk (Hrsg.), Lehrbuch der Allgemeinen Pathologie und der Pathologischen Anatomie, 30. Auflage, 351 - 358
Springer Verlag, Berlin - Heidelberg - New York, 1977

19. Lin, D.C., D.A. Hessinger
Possible involvement of red blood cell membrane proteins in the hemolytic action of Portuguese Man-of-War toxin.
Biochem. biophys. Res. Commun. 91, 761 - 769 (1979)

20. Lux, S.E.
Dissecting the red cell membrane skeleton.
Nature 281, 426 - 429 (1979)

21. Nieciecki, A.v.
Unveröffentlichte Ergebnisse

22. Pethica, B.A., J.H. Schulman
The physical Chemistry of Haemolysis by Surface-active agents.
Biochem. J. 53, 177 - 185 (1953)

23. Ponder, E.
Hemolysis and related phenomena
Grune and Stratton, New York, 1948

24. Reman, F.C., R.A. Demel, J. De Gier, L.L.M. Van Deenen, H. Eibl, O. Westphal
Chem. Phys. Lipids 3, 221 - 233 (1969)

25. Schlösser, E.
Interaction of saponins with cholesterol, lecithin, and albumin.
Can.J. Physiol.Pharmac. 47, 487 - 490 (1969)

26. Schmidt, R.F., G. Thews
Einführung in die Physiologie des Menschen, 18. Auflage, 328 - 329
Springer Verlag, Berlin - Heidelberg - New York, 1976

27. Schmidt, H.
Kurze Einführung in die Chemie der Flavonoide unter besonderer Berücksichtigung der O-(ß-Hydroxyethyl)-rutoside.
In: Voelter-Jung, a.a.O., S. 1 - 9

28. Seeger, R.
Studies on Rubescenslysin Haemolysis.
Naunyn - Schmiedeberg's Arch. Pharmac. 311, 95 - 103 (1980)

29. Seeman, P.
Erythrocyte membrane stabilization by steroids and alcohols; a possible model for anesthesia.
Biochem.Pharmacol. 15, 1632 - 1637 (1966)

30. Seeman, P., J. Weinstein
I. Erythrocyte membrane stabilization by tranquilizers and antihistamines.
Biochem.Pharmacol. 15, 1737 - 1752 (1966)

31. Seeman, P.
II. Erythrocyte membrane stabilization by local anesthetics and tranquilizers.
Biochem.Pharmacol. 15, 1753 - 1766 (1966)

32. Seeman, P.
III. A method for distinguishing specific from nonspecific Hemolysis.
Biochem.Pharmacol. 15, 1767 - 1774 (1966)

33. Seeman, P.
The membrane actions of Anesthetics and Tranquilizers.
Pharmacol. Rev. 24, 583 - 655 (1972)

34. Segal, R., J. Milo-Goldzweig, M. Seiffe
The hemolytic properties of non-ionic hemolysins.
Life Sci. 11, 61 - 70 (1972)

35. Segal, R., P. Shatkovsky, J. Milo-Goldzweig
On the mechanism of saponin hemolysis - I
Hydrolysis of the glycosidic bond.
Biochem.Pharmacol. 23, 973 - 981 (1974)

36. Segal, R., J. Milo-Goldzweig
On the mechanism of saponin hemolysis - II
Inhibition of hemolysis by aldonolactones.
Biochem.Pharmacol. 24, 77 - 81 (1975)

37. Segal, R., J. Milo-Goldzweig, G. Kaplan
The protective action of glycyrrhizin against
saponin toxicity.
Biochem.Pharmacol. 26, 643 - 645 (1977)

38. Segal, R., J. Milo-Goldzweig
The susceptibility of Cholesterol-depleted
Erythrocytes to Saponin and Sapogenin Hemolysis.
Biochim. Biophys. Acta 512, 223 - 226 (1978)

39. Shany, S., A.W. Bernheimer, P.S. Grushoff, K.S. Kim
Evidence for membrane cholesterol as the common binding site for cereolysin, streptolysin O and saponin.
Molec. cell. Biochem. 3, 179 - 186 (1974)

40. Sheetz, M.P., S.J. Singer
Biological Membranes as Bilayer Couples. A molecular
Mechanism of Drug-Erythrocyte Interactions.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 71, 4457 - 4461 (1974)

41. Steck, T.L.
The organization of Proteins in the Human Red Blood
cell membrane.
The Journal of Cell Biology 62, 1 - 19 (1974)

42. Thoma, K., E. Vasters
Photoinstabilität und Stabilisierung von Phenothiazinen.
Pharm.Ztg. 119, 1430 - 1435 (1974)

43. Weltzien, H.U.
Slow-reacting hemolytic Phosphatides: Benzylated
Lysolecithins.
Biochim. Biophys. Acta

44. Wildenauer, D.
mündliche Mitteilung

45. Zaslavsky, B.Y., N.N. Ossipov, S.V. Rhogozhin
Action of surface-active substances on biological
membranes - III. Comparison of hemolytic activity
of ionic and nonionic surfactants.
Biochim. Biophys. Acta 510, 151 - 159 (1978)

LEBENSLAUF

Herbert Biesendorfer, geb. 27.05.1951 in Freising

Eltern:	Josef Biesendorfer Josefa Biesendorfer, geb. Böck
1957 - 1965	Volksschule Freising-Lerchenfeld Abschluß Juli 1965
1965 - 1969	Staatliche Realschule Moosburg Mittlere Reife Juli 1969
1969 - 1970	Fernmeldepraktikum beim Fernmeldeamt 2, München
1970 - 1971	Fachoberschule Freising Fachhochschulreife Juli 1971
1971	Wehrdienst bis zur Anerkennung als Kriegsdienstverweigerer
1972	Zivildienst in der Privatklinik Dr. Vogel in Furth bei Deisenhofen
1973 - 1975	Josef-Hofmiller-Gymnasium Freising (math.-naturwissenschaftl. Zweig) Abitur Juli 1975
SS 1976 - SS 1982	Studium der Humanmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität München
	Staatsexamen bestanden am 03.05.1982
	Approbation als Arzt erhalten am 10.05.1982
	April 1979 bis Juni 1980: Doktorarbeit am Pharmakologischen Institut der LMU München
Seit August 1982	Assistenzarzt am Kreiskrankenhaus Vilsbiburg, Anästhesie-Abteilung